



**Sónia Regina
Rodrigues Mota
Monteiro**

**Estratégias de alteração da funcionalidade de
proteínas de soja**



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2013

**Sónia Regina
Rodrigues Mota
Monteiro**

Estratégias de alteração da funcionalidade de proteínas de soja

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica, realizada sob a orientação científica do Doutor José António Teixeira Lopes da Silva, Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Apoio financeiro do POPH-QREN,
comparticipado pelo Fundo Social
Europeu e por fundos nacionais do
MCTES

Apoio financeiro da FCT e do FSE no
âmbito do III Quadro Comunitário de
Apoio.



Ao Nelson e à minha Bia

o júri

presidente

Doutor Anibal Manuel de Oliveira Duarte
Professor Catedrático da Universidade de Aveiro

Doutora Maria Luisa Duarte Martins Beirão da Costa
Professora Catedrática aposentada da Universidade Técnica de Lisboa

Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo
Professora Associada com agregação da Universidade de Aveiro

Doutora Anabela Cristina da Silva Naret Moreira Raymundo
Professora Associada do Instituto Superior de Estudos Interculturais e
Transdisciplinares de Almada- Instituto Piaget

Doutor José António Teixeira Lopes da Silva
Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro

Doutora Cristina Maria Ribeiro Rocha Soares Vicente
Investigadora Auxiliar do laboratório Associado REQUIMTE- Rede de Química
e Tecnologia

agradecimentos

Ao finalizar este trabalho, deixo aqui expressos os meus agradecimentos a todos os que de alguma forma contribuíram para a sua realização.

Agradeço ao Prof. Doutor Lopes da Silva, orientador científico deste trabalho, toda a liberdade de pensamento e decisão que me concedeu. Agradeço ainda os ensinamentos teóricos e técnicos que me transmitiu na área da reologia, para além do rigor científico que incutiu ao trabalho.

À Prof. Doutora Ivonne Delgadillo, agradeço a oportunidade de me ter inserido no grupo de Bioquímica e Química dos Alimentos da Universidade de Aveiro.

Ao Doutor Jorge Saraiva pelo seu apoio, simpatia, e colaboração nos ensaios de alta pressão.

Ao Prof. Doutor Cruz Pinto pela sua disponibilidade e ensinamentos na execução e interpretação dos ensaios de DSC.

À Doutora Sandra Rebelo pela sua colaboração na área da Microscopia Confocal, para além de todo o incentivo e apoio.

A todos os meus colegas do grupo de Bioquímica, o meu agradecimento pelo apoio e companheirismo que serviu de estímulo ao longo de todos estes anos. Obrigada pelos bons momentos e pelas palavras sempre amigas.

Um especial agradecimento à Alexandra Nunes pela sua generosidade, ensinamentos e amizade. À Cláudia Nunes pelo apoio prestado na realização experimental do trabalho mas acima de tudo pelo incentivo constante e pelo ombro amigo sempre disponível nas horas mais difíceis.

À Angela, companheira de laboratório, por toda a ajuda, desabafo e apoio.

À Dulce pelo carinho e disponibilidade sempre que solicitada.

Às amigas que, apesar de longe, estiveram e estarão sempre perto, Fabiane, Bia e Isabel Correia e a todos aqueles que partilharam comigo o laboratório de reologia.

Aos meus Pais, restante família e amigos por todo o apoio e carinho que sempre me transmitiram.

Ao Nelson pelo seu amor, compreensão e pelas constantes palavras de incentivo...e à minha pequena Bia por todos os mimos e sorrisos!

A todos, o meu Muito Obrigada!!!

palavras-chave

Proteínas de soja, propriedades funcionais, gelificação, microestrutura, interações proteína-polissacarídeo, galactomananas, hidrolisados de proteínas de soja, alta pressão.

resumo

Este trabalho teve como principal objetivo estudar e modificar as propriedades funcionais das proteínas de soja de forma a otimizar e diversificar a sua aplicação industrial. Para tal, foram propostas e estudadas quatro estratégias: i) extração do isolado de proteínas de soja (IPS) a partir de diferentes matérias-primas, ii) adição de galactomananas (GM) com graus de ramificação e massas moleculares diferentes, iii) hidrólise enzimática controlada das proteínas de soja, iv) processamento por alta pressão hidrostática. O estudo e a interpretação da influência destas estratégias sobre as propriedades funcionais das proteínas de soja, nomeadamente, na capacidade gelificante e emulsionante, foram realizados recorrendo fundamentalmente a ensaios reológicos dinâmicos a baixas deformação, espectroscopia de infravermelho, electroforeses, calorimetria diferencial de varrimento e ensaios de microscopia confocal de varrimento laser.

O estudo da extração e caracterização dos isolados de proteínas de soja obtidos a partir de diferentes matérias-primas permitiu concluir que as características físico-químicas dos isolados são dependentes da origem da matéria-prima de extração e da severidade dos tratamentos industriais prévios à extração do isolado. Contudo, as propriedades viscoelásticas dos géis obtidos por aquecimento controlado não foram significativamente distintas embora tenha sido possível relacionar o grau de agregação com a diminuição da temperatura de gelificação e com o aumento inicial dos módulos viscoelásticos. As alterações sofridas pelos isolados de origem comercial mostraram ser irreversíveis resultando em géis menos rígidos e com maior carácter viscoso.

A adição de galactomanana alterou significativamente o mecanismo de gelificação induzido termicamente das proteínas de soja, bem como as propriedades viscoelásticas dos géis e a microestrutura dos géis, demonstrando-se a ocorrência de separação de fases, em virtude da incompatibilidade termodinâmica entre os biopolímeros, resultando em géis mais rígidos e no decréscimo da temperatura de gelificação. A extensão destas alterações foi dependente da massa molecular, grau de ramificação e da razão IPS/GM.

O efeito da hidrólise enzimática por ação da bromelina, nas propriedades gelificantes e emulsionantes das proteínas de soja, mostrou ser dependente do grau de hidrólise (GH). Valores de GH inferiores a 15 % melhoraram as propriedades gelificantes das proteínas de soja.

Por outro lado, o aumento do GH teve um efeito negativo nas propriedades emulsionantes, o qual foi atenuado por adição da goma de alfarroba, com efeito positivo na gelificação das proteínas de soja. A concentração crítica limite de compatibilidade entre os hidrolisados de proteína de soja e a goma de alfarroba aumentou com o decréscimo do GH e da massa molecular do polissacarídeo.

O efeito da AP sobre as propriedades físico-químicas e funcionais dos IPS foi influenciado pela origem do isolado e pelas condições de tratamento. O processamento até 100 MPa desencadeou um aumento da atividade emulsionante e considerável melhoria da capacidade gelificante. Contudo, valores de pressão superiores promoveram a desnaturação das proteínas constituintes dos isolados, resultando no decréscimo da temperatura de gelificação e numa re-associação das subunidades proteicas, diminuindo a elasticidade dos géis finais. Os resultados sugeriram que as alterações nas proteínas de soja promovidas durante o tratamento por AP constituem um fator limitante para o desdobramento e re-associação durante o aquecimento térmico, necessários para a formação e fortalecimento de gel formado. O processamento por AP influenciou a estrutura secundária e a microestrutura das amostras. A presença de GA teve um papel baroprotetor.

Assim, com este trabalho demonstrou-se que com as estratégias seguidas para manipulação das propriedades funcionais de proteínas de soja, nomeadamente através da adição de um polissacarídeo com propriedades estruturais controladas, da adequada combinação da adição de um polissacarídeo neutro com a hidrólise controlada das proteínas ou com tratamento por alta pressão, é possível a criação de novas funcionalidades, com utilidade no desenvolvimento de novas formulações alimentares, permitindo expandir a aplicação destas proteínas vegetais.

keywords

Soy proteins, functional properties, gelation, microstructure, protein-polysaccharide interactions, galactomannans, soy protein hydrolysates, high pressure.

abstract

The main objective of this work was the modification of the functional properties of soybean proteins in order to optimize and diversify their industrial applications. For this purpose, four strategies have been studied: i) extraction of soy protein isolate from different raw materials, ii) addition of galactomannans (GM) with different molecular weight and degree of branching, iii) partial enzymatic hydrolysis of the proteins and iv) processing by high hydrostatic pressure. The resulting effects of these approaches on the protein functional properties, namely gelation and emulsification, were assessed using mainly dynamic rheological tests at low deformation, FTIR spectroscopy, electrophoresis, differential scanning calorimetry and confocal laser scanning microscopy.

The study of extraction and characterization of soy protein isolates obtained from different raw materials led to the conclusion that physico-chemical properties of the isolates are influenced by the source of the raw material and the severity of industrial processes prior to extraction. However, the viscoelastic properties of the gels obtained by controlled heating were not significantly different, although a correlation was demonstrated between the degree of aggregation and the decrease in gelation temperature and the increase of the initial value of the viscoelastic modules. The changes undergone by the commercial isolates were irreversible, resulting in less rigid and more viscous gels.

The addition of galactomannan changed significantly the mechanism of thermally induced gelation of soy proteins, as well as the viscoelastic properties and microstructure of gels, related to the occurrence of demixing and phase separation resulting in an array of microstructures, spanning emulsion-like, bicontinuous and aggregated morphologies. The extent of these changes was dependent on polysaccharide molecular weight and degree of branching, and on the IPS/GM ratio. The presence of the GM promoted the gelation to occur for protein concentration below the critical gelation of soybean proteins alone, decreased the gelling temperature and had a positive effect on the gel strength of the heat-induced gels. The effects were more pronounced as the degree of branching decreases and for GM with higher molecular weight.

The gelling ability and emulsifying properties of soybean proteins can be changed by controlled hydrolysis. Depending on the degree of hydrolysis (DH) it can either be improved or impaired. At DH below 15 %, stronger gels with lower gelation temperatures could be achieved. However, at the higher DH this effect was impaired. Increasing DH had a negative effect on the emulsifying properties, which was attenuated by the addition of locust bean gum with a positive influence on the gelation of soybean proteins.

The critical concentration of compatibility between the soy protein hydrolysates and locust bean gum increased with the lowering of DH and molecular weight of the polysaccharide.

The effect of high hydrostatic pressure on physico-chemical and functional properties of IPS was dependent on the source and extraction method of soy protein isolates. Processing pressures up to 100 MPa improved emulsifying and gelation properties. Higher values of pressure promoted denaturation of the isolated proteins, resulting in a decrease in gelation temperature, and a re-association of protein subunits associated to a decreasing of the gel elasticity. The results suggested that changes in soy protein promoted during the high-pressure treatment hinder the conformational changes and the re-association of the protein chains during the thermal heating causing gelation delay and decreasing the gel strength. The processing by high pressure had an impact on the secondary structure and microstructure of the samples. The presence of galactomannan had a baroprotector function.

Therefore, this work has demonstrated that with the strategies followed for manipulating the functional properties of soy proteins, including the addition of a polysaccharide with controlled structural properties, the appropriate combination of the addition of a neutral polysaccharide with the protein partial hydrolysis or with high-pressure treatment, it is possible to create new functionalities potentially useful in the development of new food formulations, allowing to expand the application of these plant proteins.

ÍNDICE GERAL

Introdução geral	1
CAPÍTULO 1	
<i>Revisão Bibliográfica</i>	
Introdução	7
1.1 Soja	7
1.2 Caracterização das proteínas de soja	9
1.2.1 β -Conglicinina	10
1.2.2 Glicinina	10
1.3 Propriedades funcionais das proteínas	11
1.3.1 Solubilidade proteica	12
1.3.2 Propriedades emulsionantes das Proteínas	14
1.3.3 Propriedades gelificantes das Proteínas	15
1.3.3.1 Fatores intrínsecos que influenciam o processo de gelificação	16
1.3.3.2 Fatores extrínsecos que influenciam o processo de gelificação	18
1.3.3.3 Mecanismos de gelificação de proteínas globulares	20
1.3.3.4 Gelificação térmica de isolados de proteína de soja	23
1.4 Sistemas mistos proteínas-polissacarídeos	28
1.4.1 Interações entre proteínas e polissacarídeos	28
1.4.2 Gelificação de sistemas mistos proteínas de soja-polissacarídeos	30
1.5 Métodos para caracterização de sistemas proteicos e sistemas mistos proteínas-polissacarídeos	36
1.5.1 Métodos reológicos	36
1.5.2 Análise térmica	41
1.5.3 Microscopia de géis	42
1.5.3.1 Microscopia eletrônica de varrimento	42
1.5.3.2 Microscopia confocal de varrimento de laser	43
1.5.4 espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier	43
Referências bibliográficas	46

CAPÍTULO 2

Obtenção e avaliação das propriedades físico-químicas e funcionais de isolados de proteína de soja obtidos a partir de diferentes matérias-primas

2.1 Introdução	57
2.2 Materiais e Métodos	63
2.2.1 Matérias-primas	63
2.2.2 Extração do isolado de proteínas de soja a partir de diferentes matérias-primas	63
2.2.2.1 Obtenção da farinha de soja desengordurada	63
2.2.2.2 Extração do isolado de proteínas de soja a partir da farinha de soja desengordurada	64
2.2.3 Caracterização físico-química dos IPS	66
2.2.3.1 Determinação de Cinzas e Humidade	66
2.2.3.2 Teor lipídico	66
2.2.3.3 Teor proteico	66
2.2.3.4 Composição proteica dos IPS	66
2.2.3.5 Turbidez das dispersões aquosas dos IPS	68
2.2.3.6 Solubilidade dos IPS	68
2.2.3.7 Grupos sulfidrilo livres	69
2.2.3.8 Análise dos IPS por espectroscopia de infravermelho (FT-IR)	69
2.2.3.9 Composição proteica das frações solúveis dos IPS	69
2.2.3.10 Análise térmica por calorimetria diferencial de varrimento	70
2.2.4 Caracterização reológica dos géis dos IPS	70
2.2.4.1 Preparação das dispersões de IPS	70
2.2.4.2 Ensaio não isotérmico	71
2.2.4.3 Ensaio isotérmico	71
2.2.5 Análise estatística	72
2.3 Resultados e Discussão	72
2.3.1 Composição dos IPS	72
2.3.2 Turbidez dos IPS	74
2.3.3 Solubilidade dos IPS	76
2.3.4 Grupos sulfidrilo livres dos IPS	78
2.3.5 Análise dos IPS por espectroscopia de infravermelho	79

2.3.5.1 Avaliação da eficiência da remoção laboratorial do óleo de soja	79
2.3.5.2 Caracterização estrutural dos IPS por FT-IR	82
2.3.6 Composição da fração solúvel dos IPS	85
2.3.7 Análise térmica por calorimetria diferencial de varrimento	89
2.3.8 Caracterização reológica dos IPS	91
2.3.8.1 Identificação da zona de comportamento viscoelástico linear	91
2.3.8.2 Ensaio não-isotérmico	92
2.3.8.3 Ensaio isotérmico	96
2.3.9 Considerações finais	101
Referências Bibliográficas	103

CAPÍTULO 3

Modificação das propriedades gelificantes das proteínas de soja por adição de galactomananas: Efeito do grau de ramificação e da massa molecular do polissacarídeo

3.1 Introdução	110
3.1.1 Galactomananas	110
3.1.2 Modificação estrutural de galactomananas por hidrólise enzimática	112
3.1.3 Propriedades reológicas de galactomananas	114
3.1.4 Efeito de galactomananas nas propriedades gelificantes de proteínas de soja	118
3.2 Material e Métodos	119
3.2.1. Amostras	119
3.2.2 Preparação das amostras de polissacarídeos	119
3.2.2.1 Purificação das amostras comerciais	119
3.2.2.2 Modificação enzimática da goma de alfarroba com β -mananase	120
3.2.3 Preparação de soluções	121
3.2.3.1 Preparação de soluções de galactomananas	121
3.2.3.2 Preparação de dispersões de isolado de proteína de soja	122
3.2.3.3 Preparação de misturas GM/IPS	122
3.2.4 Caracterização físico-química dos polissacarídeos	123
3.2.4.1 Determinação de cinzas, humidade e proteínas	123
3.2.4.2 Determinação de massas moleculares das galactomananas por GPC	123

3.2.4.3 Determinação da viscosidade intrínseca	124
3.2.4.4 Determinação da razão manose/galactose	124
3.2.5 Caracterização reológica	125
3.2.5.1 Equipamento	125
3.2.5.2 Métodos reológicos utilizados	125
3.2.5.2.1 Caracterização das soluções de polissacarídeos	125
3.2.5.2.2 Caracterização das géis de IPS e das misturas IPS/GM	126
3.2.6 Microscopia confocal de varrimento de laser	127
3.3. Resultados e Discussão	128
3.3.1 purificação das galactomananas	128
3.3.2 Seleção das amostras de galactomananas modificadas	129
3.3.3 Caracterização físico-química dos polissacarídeos selecionados	130
3.3.3.1 Razão manose/galactose	130
3.3.3.2 Massa molecular e viscosidade intrínseca	131
3.3.4 Caracterização reológica dos polissacarídeos selecionados	136
3.3.4.1 Ensaio de escoamento	136
3.3.4.2 Ensaio de oscilação	142
3.3.5 Gelificação do IPS	143
3.3.5.1 Efeito da temperatura máxima e da taxa de aquecimento	144
3.3.5.2 Efeito da concentração de IPS	146
3.3.5.3 Identificação da zona de comportamento viscoelástico linear	150
3.3.5.4 Ensaio isotérmico	151
3.3.6 Efeito das galactomananas na gelificação de IPS	153
3.3.6.1 Efeito da adição e origem da galactomanana	154
3.3.6.1.1 Ensaio reológico não isotérmico	154
3.3.6.1.2 Ensaio reológico isotérmico	166
3.3.6.1.3 Microscopia confocal de varrimento laser	173
3.3.6.2 Efeito da massa molecular da galactomanana na gelificação do IPS	180
3.3.6.2.1 Ensaio reológico não isotérmico	180
3.3.6.2.2 Ensaio reológico isotérmico	191
3.3.6.2.3 Microscopia confocal de varrimento laser	198
3.4 Considerações finais	203

CAPÍTULO 4***Avaliação das propriedades funcionais de hidrolisados enzimáticos de proteínas de soja e suas misturas com goma de alfarroba***

4.1 Introdução	215
4.1.1 Hidrólise enzimática de proteínas	215
4.1.1.1 Processos para obtenção de hidrolisados enzimáticos de proteína	216
4.1.1.2 Fatores que influenciam a hidrólise enzimática de proteínas	217
4.1.1.3 Enzimas utilizadas na hidrólise enzimática de proteínas de soja	221
4.1.1.4 Grau de hidrólise e métodos para sua determinação	222
4.1.2 Propriedades funcionais de hidrolisados de proteínas de soja	223
4.2 Materiais e Métodos	226
4.2.1 Amostras	226
4.2.2 Hidrólise enzimática do IPS	226
4.2.3 Preparação de dispersões dos hidrolisados e misturas com goma de alfarroba	227
4.2.3 Caracterização dos hidrolisados enzimáticos obtidos	227
4.2.3.1 Determinação do grau de hidrólise	227
4.2.3.2 Solubilidade dos hidrolisados	228
4.2.3.3 Turbidez dos hidrolisados	228
4.2.3.4 Distribuição de tamanhos de partículas	228
4.2.3.5 Análise dos hidrolisados por espectroscopia de infravermelho	229
4.2.3.6 Análise por microscopia eletrônica de varrimento	229
4.2.3.7 Avaliação da capacidade gelificante dos hidrolisados e das misturas hidrolisados/GA	229
4.2.3.8 Avaliação da capacidade emulsionante dos hidrolisados e das misturas hidrolisados/GA	231
4.2.3.9 Análise estatística	232
4.3 Resultados e Discussão	232
4.3.1 Caracterização dos hidrolisados enzimáticos obtidos	232
4.3.1.1 Grau de hidrólise e solubilidade dos hidrolisados	232
4.3.1.2 Turbidez dos hidrolisados	234
4.3.1.3 Tamanho de partículas constituintes dos hidrolisados	235

4.3.1.4 Análise quimiométrica dos espectros de FT-IR	238
4.3.1.5 Microestrutura	241
4.3.2 Capacidade gelificante dos hidrolisados enzimáticos obtidos e suas misturas com GA	243
4.3.2.1 Comportamento viscoelástico durante a formação do gel	243
4.3.2.2 Comportamento viscoelástico dos géis formados	249
4.3.2.3 Maturação dos géis a 80 °C	251
4.3.3 Efeito da massa molecular da GA na gelificação dos hidrolisados de IPS	255
4.3.4 Capacidade emulsionante dos hidrolisados enzimáticos obtidos e suas misturas com GA	260
4.4 Considerações finais	265
Referências bibliográficas	267

CAPÍTULO 5

Efeito do processamento por alta pressão hidrostática nas propriedades estruturais e funcionais de isolados de proteína de soja e suas misturas com galactomananas

5.1 Introdução	275
5.1.1 Efeito da alta pressão nas propriedades funcionais de proteínas	275
5.1.2 Efeito da alta pressão nas propriedades estruturais de proteínas	280
5.1.3 Efeito da alta pressão nas interações proteínas-polissacarídeos	282
5.2 Materiais e Métodos	285
5.2.1 Preparação das soluções de proteína de soja	285
5.2.2 Preparação das soluções de galactomanana	286
5.2.3 Preparação das misturas IPS/GA	286
5.2.4 Processamento por alta pressão	287
5.2.5 Avaliação dos efeitos da alta pressão nas propriedades físico-químicas e funcionais do IPS e das misturas IPS/GA	288
5.2.5.1 Solubilidade	288
5.2.5.2 Turbidez	289
5.2.5.3 Grupos sulfidrilo livres	289
5.2.5.4 Distribuição de tamanhos de partículas	289
5.2.5.5 Composição da fração proteica solúvel das amostras	290
5.2.5.5.1 Preparação da fração solúvel das amostras	290

5.2.5.5.2 Separação electroforética	290
5.2.5.5.3 Revelação das proteínas	290
5.2.5.6 Atividade emulsionante	291
5.2.5.7 Capacidade gelificante	291
5.2.6 Avaliação dos efeitos da AP nas propriedades estruturais do IPS e das misturas IPS/GA	292
5.2.6.1 Análise espectroscópica por FT-IR	292
5.2.6.2 Análise por microscopia eletrónica de varrimento	293
5.2.7 Análise estatística	293
5.3 Resultados e Discussão	293
5.3.1 Seleção das condições de processamento	293
5.3.2 Efeito da AP na solubilidade e turbidez de IPS e nas misturas IPS/GA	294
5.3.3 Efeito da AP no conteúdo em grupos sulfidrilo dos IPS e das misturas IPS/GA	300
5.3.4 Efeito da AP na distribuição de tamanhos dos constituintes do IPS _C e das misturas IPS _C /GA	303
5.3.5 Efeito da AP na composição proteica da fração solúvel dos IPS e das misturas IPS/GA	305
5.3.6 Efeito da AP na atividade emulsionante dos IPS e das misturas IPS/GA	309
5.3.7 Efeito da AP na capacidade gelificante dos IPS e das misturas IPS/GA	313
5.3.8 Efeito da AP nas propriedades estruturais dos IPS e das misturas IPS/GA	321
5.3.9 Efeito da AP na microestrutura dos IPS e das misturas IPS/GA	325
5.4 Considerações finais	328
Referências bibliográficas	329
 Conclusões finais e trabalho futuro	 333

Lista de Símbolos e Abreviaturas

δ	ângulo de perda ou de fase	
ω	frequência de oscilação	(rad/s)
α	taxa de aquecimento	
γ	deformação	
η_0	viscosidade a taxa de deformação nula	(Pa.s)
ΔH	entalpia de desnaturação	
η_{rel}	viscosidade relativa	
η_s	viscosidade do solvente	(Pa.s)
η_{sp}	viscosidade específica	
η_{sp0}	viscosidade específica a taxa de deformação nula	
$[\eta]$	viscosidade intrínseca	(dL/g)
a	constante de Mark-Houwink	
AP	alta pressão hidrostática	
BCA	método do ácido bicinconínico	
C	concentração	(g/dL)
C^*	concentração crítica	(g/dL)
$C[\eta]$	parâmetro de interpenetração macromolecular	
CLSM	microscopia confocal de varrimento laser	
FTIR	espectroscopia de infravermelho	
AP	alta pressão hidrostática	
IPS _C	isolado de proteína de soja comercial	
IPS _L	isolado de proteína de soja laboratorial	
G'	módulo de armazenamento, de conservação ou elástico	(Pa)
GH	grau de hidrólise	(%)
G''	módulo de perda ou viscoso	(Pa)
GA	goma de alfarroba	
G _{com}	goma de alfarroba comercial	
gal	galactose	

GA _{pur}	goma de alfarroba purificada	
GC	cromatografia de fase gasosa	
GG	goma de guar	
GG _{com}	goma de guar comercial	
GG _{pur}	goma de guar purificada	
GM	galactomanana	
GPC	cromatografia de permeação em gel	
GT	goma de tara	
GT _{com}	goma de tara comercial	
GT _{pur}	goma de tara purificada	
GX	goma xantana	
IPS	isolado de proteínas de soja	
<i>k</i>	coeficiente de consistência	
K'	constante de Huggins	
K'	constante de Kraemer	
k-car	k-carragenina	
<i>M</i>	constante para avaliação do grau de dependência de G' com a frequência de oscilação	
<i>m</i>	declive	
man	manose	
M _n	massa molecular média em número	(kDa)
MM	massa molecular	(kDa)
M _w	massa molecular média em massa	(kDa)
<i>pI</i>	ponto isoelétrico	
r.p.m.	rotações por minuto	
MEV	microscopia eletrónica de varrimento	
SH	grupos sulfidrilo	
tan δ	tangente do ângulo de perda	
T _d	temperatura de desnaturação	(°C)
T _{d1}	temperatura de desnaturação da β-conglicinina	
T _{d2}	temperatura de desnaturação da glicinina	
T _{gel}	temperatura de gelificação	(°C)

t_{gel}	tempo de gelificação	(min)
T_{max}	temperatura máxima	(°C)
IAE	índice da atividade emulsionante	(m ² /g)
IEE	índice de estabilidade da emulsão	(min)
DLS	dispersão dinâmica da luz	
7S	β-conglicinina	
11S	glicinina	

*“De tudo, ficaram três coisas:
A certeza de que estamos começando
A certeza de que precisamos continuar
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar
Portanto,
Devemos fazer da interrupção, um caminho novo
Da queda, um passo de dança
Do medo, uma escada
Do sonho, uma ponte
Da procura, um encontro”*

Fernando Pessoa

Introdução geral

A preferência do consumidor por alimentos com melhores propriedades nutricionais tem impulsionado a indústria a reduzir ou substituir ingredientes como gorduras, hidratos de carbono e aditivos, vulgarmente introduzidos nos sistemas alimentares para manipulação da textura, por proteínas e derivados. Assim, o desejo da indústria alimentar em criar produtos de valor acrescentado tem inspirado o crescente interesse no desenvolvimento de processos que otimizem a funcionalidade das proteínas. Esta tendência tem motivado o desenvolvimento de ingredientes proteicos para melhorar as propriedades funcionais dos produtos alimentares, o que requer o conhecimento da funcionalidade das proteínas em termos moleculares.

A soja tem um papel importante na alimentação humana e o seu consumo pode ser justificado pelo elevado valor nutricional, alto conteúdo proteico e elevada produtividade. No entanto, o principal interesse industrial da sua utilização está associado a propriedades funcionais atrativas, nomeadamente nutracêuticas, das suas proteínas, (Kinsella, 1979). Aliada a esta grande aplicabilidade, a soja é capaz de contribuir para a prevenção de uma série de doenças como as cardiovasculares, além de auxiliar na prevenção do cancro e osteoporose.

Dadas as potencialidades nutricionais e industriais das proteínas de soja, tornou-se interessante explorar estratégias para diversificar a funcionalidade destas proteínas de modo a alargar as suas aplicações a nível alimentar.

O uso da proteína de soja como ingrediente funcional depende primariamente das propriedades físico-químicas que governam a estrutura e os atributos conformacionais da proteína. No caso dos alimentos, os sistemas são multicomponentes, sendo que proteínas e polissacarídeos contribuem conjuntamente para a sua estrutura, textura e estabilidade, através das suas propriedades espessantes, gelificantes e de superfície.

Embora muitos trabalhos tenham sido realizados sobre as propriedades funcionais das proteínas de soja, ainda pouco se sabe sobre as propriedades funcionais de sistemas mistos de proteína de soja e polissacarídeos neutros, nomeadamente galactomananas, as quais apresentam considerável interesse devido ao seu baixo custo e propriedades funcionais atrativas (Fox, 1997), designadamente solubilidade, elevada capacidade espessante e estabilizante.

Assim, o objetivo principal deste trabalho de doutoramento foi diversificar e melhorar as propriedades funcionais das proteínas de soja através da utilização e combinação de diferentes estratégias já demonstradas como úteis para a manipulação da funcionalidade de proteínas de modo a contribuir para um melhor conhecimento e controlo das propriedades reológicas e estruturais de sistemas alimentares contendo proteínas de soja.

Como objetivos específicos deste trabalho mencionam-se os seguintes:

- 1) Extração e a caracterização físico-química e funcional de isolados de proteína de soja obtidos laboratorialmente a partir dos produtos intermediários da extração industrial do óleo de soja, comparação com as características de isolados de proteína de soja (IPS) comerciais e avaliação do efeito do tratamento industrial das matérias primas sobre as propriedades desses IPS;
- 2) Caracterização do efeito de polissacarídeos neutros nas propriedades funcionais de proteínas de soja, principalmente na gelificação, avaliando a influência de determinadas características estruturais do polissacarídeo, nomeadamente o grau de ramificação e massa molecular;
- 3) Avaliar o efeito da hidrólise enzimática parcial das proteínas de soja sobre as suas propriedades funcionais, concretamente sobre a capacidade gelificante e emulsionante desses hidrolisados e das suas misturas com goma de alfarroba;
- 4) Avaliar o efeito de diferentes condições de processamento por alta pressão nas propriedades estruturais e funcionais de isolados de proteína de soja, comercial e laboratorial, e comparar o efeito deste processamento nas misturas IPS/goma de alfarroba.

De forma a alcançar o objetivo geral proposto utilizaram-se metodologias diversificadas, nomeadamente técnicas reológicas, microscópicas e espectroscópicas.

A Figura 1 esquematiza as principais motivações e assuntos abordados nesta tese.

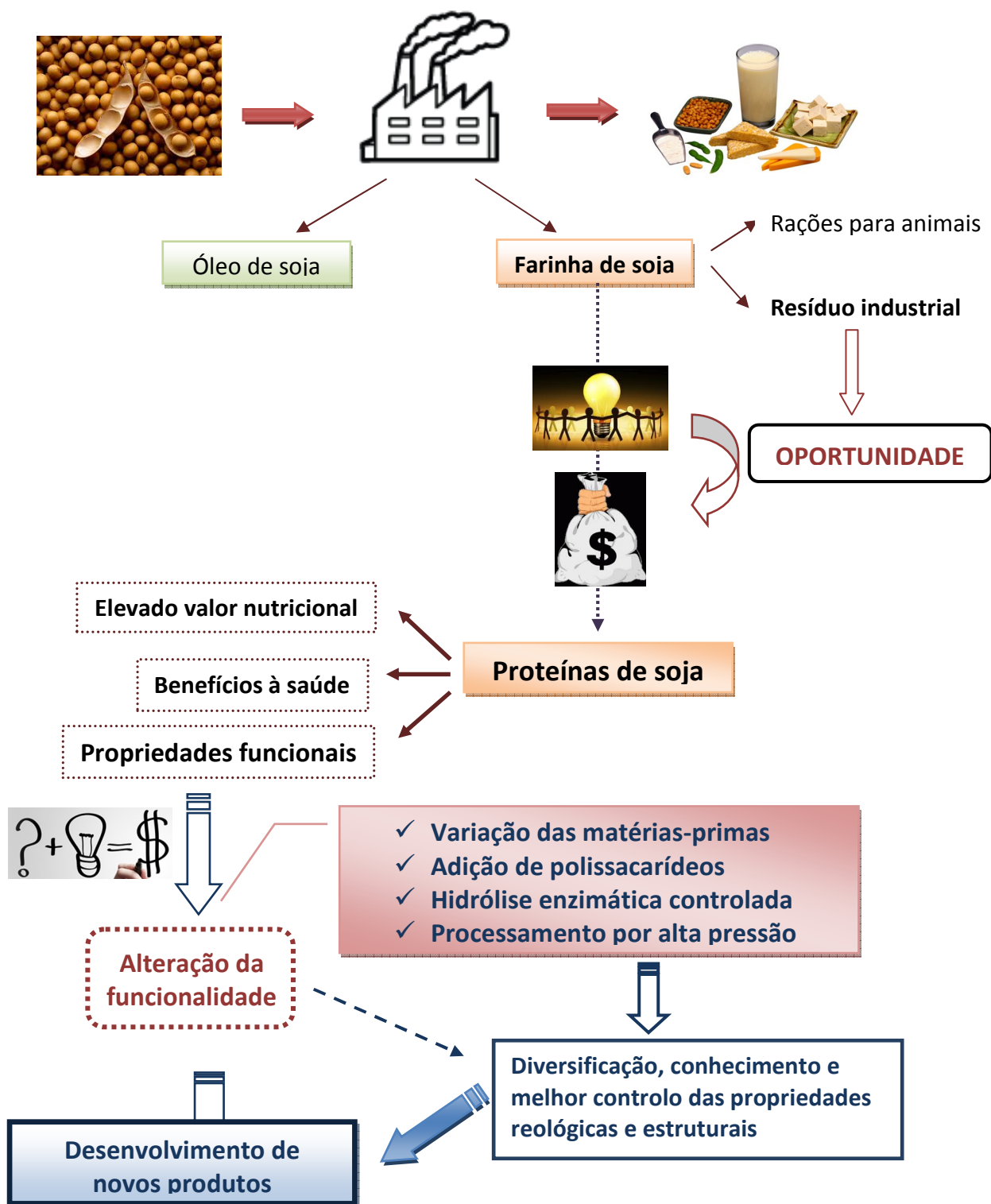


Figura 1- Principais motivações e temas explorados na tese

Esta tese está organizada em cinco capítulos. No primeiro apresenta-se uma revisão bibliográfica sobre os temas abordados neste trabalho, nomeadamente sobre as características das proteínas de soja, sobre as propriedades de sistemas mistos proteína-polissacarídeo e sobre as principais técnicas utilizadas.

O capítulo seguinte centra-se na obtenção e avaliação das propriedades físico-químicas e funcionais de isolados de proteínas de soja obtidos a partir de diferentes sub-produtos resultantes da extração de óleo de soja. Os resultados obtidos neste capítulo permitiram seleccionar os IPS a serem utilizados nos capítulos seguintes.

No terceiro capítulo, descreve-se a modificação das propriedades gelificantes e da microestrutura dos géis de proteínas de soja por adição de galactomananas com propriedades estruturais distintas, a nível de graus de ramificação e massas moleculares. Este capítulo organiza-se em duas partes: 1) Estudo de frações de galactomananas com diferentes massas moleculares obtidas por hidrólise enzimática controlada com β -mananase, e de galactomananas com diferentes graus de ramificação; 2) Estudo das propriedades reológicas e da microestrutura de géis mistos de proteínas de soja e galactomananas.

O capítulo 4 é dedicado ao estudo das propriedades funcionais, nomeadamente da capacidade gelificante e emulsionante, de hidrolisados enzimáticos de proteínas de soja, obtidos por hidrólise enzimática parcial com bromelina e análise do efeito da adição de goma de alfarroba nessas propriedades.

Por fim, o quinto capítulo descreve o efeito do processamento por alta pressão hidrostática nas propriedades estruturais e funcionais de proteínas de soja e suas misturas com goma de alfarroba.

Fox, J.E. (1997). Seed gums. Em Imerson, A. (Ed.). *Thickening and gelling agents for food*, 17: 262-282. Londres: Blackie Academic & Professional.

Kinsella, J.E. (1979). Functional properties of soy proteins. *Journal of the American Oil Chemists's Society*, 56: 242-258.

CAPÍTULO 1

Revisão Bibliográfica

Introdução

As proteínas, em geral, representam uma importante classe de ingredientes tecnológicos funcionais por possuírem uma grande variedade de propriedades, as quais abrangem características sensoriais (cor, sabor, aroma, entre outras) até propriedades de hidratação (solubilidade, gelificação, viscosidade, sinerese), de superfície (emulsificação, capacidade de formação de espuma e de filmes) e outras relacionadas com características reológicas e de textura (elasticidade, coesão, adesividade, agregação, entre outras) (Kinsella *et al.*, 1994).

A soja, rica em proteínas, é uma leguminosa extremamente consumida por razões económicas, funcionais e nutricionais. É um alimento rico em proteínas, fibras, óleo, importante fonte de minerais (sódio, potássio, fósforo, ferro, magnésio, zinco e cálcio) e vitaminas, como tiamina (B₁), riboflavina (B₂), niacina (B₃), ácido nicotínico e ácido ascórbico. Além disso, os produtos de soja desempenham um papel importante para a saúde, na prevenção de doenças cardiovasculares, cancro e osteoporose, além de serem utilizados por pessoas alérgicas ao leite.

1.1 Soja

A soja, tradicionalmente, faz parte da cultura alimentar dos povos asiáticos, diferentemente dos países ocidentais, onde o seu consumo é mais recente. Entretanto, devido às suas qualidades nutricionais, propriedades funcionais, grande disponibilidade e baixo custo, além dos crescentes avanços na tecnologia do processamento de proteínas, o uso de alimentos à base de proteína de soja tem crescido na dieta ocidental nos últimos 20 anos (Golbitz, 1995).

A nível alimentar, as principais aplicações da proteína de soja são em produtos de panificação, fórmulas infantis, formulações para nutrição clínica, suplementos proteicos e como substituto em alimentos lácteos e cárneos. Produtos análogos ao leite ocupam um mercado representativo para o uso de isolados de proteína de soja pois são recomendados para crianças e pessoas idosas que são alérgicas à proteína do leite ou para aquelas que possuem intolerância à lactose.

Os principais componentes da soja e os responsáveis pela sua importância econômica e nutricional são a proteína e o óleo.



Figura 1.1 – Grão de soja

O componente presente em maior quantidade no grão de soja é a proteína, correspondendo, em média, a 40% do total de matéria seca.

A proteína de soja, entre as proteínas de origem vegetal, possui um dos melhores padrões de aminoácidos essenciais, com exceção dos aminoácidos sulfurados

(metionina e cisteína), para os quais apresenta baixos teores (Liu, 1997).

No processamento do grão de soja são eliminadas ou reduzidas algumas substâncias responsáveis pelos sabores indesejáveis, como é o caso de lipoxigenases (enzimas que catalisam algumas reações de hidroperoxidação de ácidos gordos polinsaturados, produzindo hexanal e ácido jasmônico, responsáveis pelo sabor característico da soja), fosfolípidos, ácidos gordos polinsaturados, além de proteínas de baixa massa molecular com atividade inibidora da tripsina. Obtém-se, deste modo, proteínas de baixa alergenicidade e alto valor nutricional, apropriadas para a alimentação humana. A extração de componentes não proteicos, a remoção de fatores antinutricionais que diminuem a digestibilidade das proteínas e a remoção e/ou inativação de odores e sabores não desejáveis têm conduzido ao desenvolvimento de produtos, tais como: farinha de soja desengordurada, concentrados e isolados proteicos de soja, hidrolisados e produtos de soja texturizados (Liu, 1997).

A *farinha de soja* possuiu aproximadamente 50 % de proteína em peso seco e é produzida a partir da moagem de flocos de soja descascados e desengordurados.

Os *concentrados de proteína de soja* são produzidos a partir da soja descascada e desengordurada através da remoção parcial dos hidratos de carbono. Estes concentrados mantêm a maior parte das fibras originalmente presentes nos grãos de soja e devem conter, pelo menos, 65 % de proteína em peso seco.

Os *isolados de proteína de soja* são produzidos a partir de flocos ou farinha desengordurada de soja através de um processo que utiliza a extração aquosa e aquecimento mínimo para inativar compostos antinutricionais. Este produto é praticamente livre de hidratos de carbono e gorduras tendo, no mínimo, 90 % de proteína em peso seco.

A extração das proteínas de soja é influenciada por diversos fatores como tamanho da partícula da farinha, histórico do tratamento térmico, tempo de armazenamento, solvatação, proporção farinha/solvente, temperatura, pH e força iônica do solvente utilizado na extração. Por exemplo, as proteínas das farinhas submetidas ao vapor são mais rapidamente desnaturadas resultando numa menor extração. Por outro lado, a inclusão no solvente de um reagente tiol, como o mercaptoetanol, aumenta significativamente o rendimento de extração proteica por promover a quebra das ligações dissulfureto originando despolimerização e maior solubilidade das proteínas (Kinsella, 1979).

1.2 Caracterização das proteínas de soja

Cerca de 90 % das proteínas existentes nos grãos de soja podem ser extraídas com água ou soluções salinas. Estas proteínas foram inicialmente classificadas, de acordo com o seu coeficiente de sedimentação, em quatro frações: 2S, 7S, 11S e 15S. A fração 2S corresponde a 22 % das proteínas extraídas em água e é composta principalmente por inibidores de tripsina. A fração 7S corresponde a 37 % das proteínas extraídas em água e contém hemaglutininas, lipoxigenases, β -amilase e globulinas 7S. A fração 11S, correspondendo a 31 % das proteínas extraídas em água, é composta pela globulina 11S enquanto que a fração 15S corresponde a 11 % das proteínas extraídas em água e apresenta-se como um dímero de glicinina estável a força iônica superior a 0.5 mol/L (Wolf e Nelsen, 1996). As globulinas 7S e 11S perfazem 68 % das proteínas do isolado (Iwabuchi e Yamauchi, 1987). A Tabela 1.1 apresenta os componentes das proteínas constituintes do grão de soja.

Tabela 1.1 – Frações proteicas da soja

Fracção	Proteína total (%)	Componentes	Massa molecular (kDa)
2S (α -conglícinina)	22	Inibidores de tripsina Citocromo C	8 - 21.5 12
7S (β e γ -conglícinina)	37	Hemaglutininas Lipoxigenases β -amilase Globulina 7S	110 102 61.7 180-210
11S (glicinina)	31	Globulina 11S	350
15S	11		600

Adaptado de Wolf, 1970

A β -conglícinina (globulina 7S) e a glicínina (globulina 11S) são as principais proteínas de soja (Hermansson, 1978). Juntamente com a α - e γ -conglícinina formam as proteínas de reserva do grão de soja com papel ativo no crescimento das sementes. As restantes proteínas têm uma função metabólica e têm de ser inativadas pelo calor de forma a eliminar os fatores antinutricionais e sabores indesejáveis. Contudo, este tratamento térmico acaba por afetar negativamente as proteínas de reserva resultando numa diminuição da solubilidade proteica e numa perda parcial da sua funcionalidade.

A β -conglícinina e a glicínina apresentam diferentes propriedades nutricionais e funcionais devido às diferenças de composição e estrutura (Yamauchi *et al.*, 1981a). É assim importante conhecer mais detalhadamente a organização estrutural destas duas proteínas de soja.

1.2.1 β -Conglicinina

A β -conglícinina, glicoproteína trimérica, com ponto isoelétrico (*pI*) 4.64 (Koshiyama, 1983) e massa molecular a variar entre 140 e 170 kDa, representa 91 % da fração 7S e é formada a partir de várias combinações das suas três subunidades, α (57-68 kDa), α' (57-72 kDa) e β (42-52 kDa) (Yamauchi *et al.*, 1981a; Sykes e Gayler, 1981). Estas subunidades são mantidas unidas por ligações hidrofóbicas e pontes de hidrogénio (Thanh e Shibasaki, 1978). As proteínas α e α' , com maior conteúdo de carboidratos do que a subunidade β , são de natureza hidrofílica e dissociam-se em condições de baixa força iónica. Por outro lado, a subunidade β caracteriza-se por ser mais hidrofóbica e não se dissocia em baixa força iónica (Hermansson, 1985). A β -conglícinina contém poucos grupos sulfidrilo e não apresenta ligações dissulfureto entre as subunidades (Thanh e Shibasaki, 1978).

1.2.2 Glicínina

A glicínina é uma proteína oligomérica heterogénea cuja massa molecular varia entre 340 e 375 kDa (Utsumi *et al.*, 1981) e é formada por polipéptidos básicos e ácidos, unidos por ligações dissulfureto. À temperatura ambiente e a pH 7.6, a glicínina forma complexos

hexaméricos (11S) enquanto a pH 3.8 existe predominantemente na forma trimérica (7S) (Wolf *et al.*, 1958; Lakemond *et al.*, 2000). Cada subunidade é composta por dois polipéptidos, um com *pI* ácido e massa molecular, aproximadamente, de 38 kDa e outro com *pI* básico e massa molecular de 20 kDa. Ambos os polipéptidos, simbolizados por A_n e B_n são unidos entre si por pontes dissulfureto intermoleculares formando assim as subunidades intermediárias (A_n-S-S-B_n) ou simplesmente AB (Badley *et al.*, 1975).

As subunidades e polipéptidos podem ser separados utilizando ureia ou agentes redutores como o β-mercaptoetanol (Liu, 1997). O ponto isoelétrico da glicinina é 4.90 (Koshiyama, 1983).

As globulinas da soja possuem estruturas quaternárias complexas que facilmente sofrem reações de associação-dissociação, dependendo das condições do meio, principalmente, temperatura, pH, força iônica e solvente (Mori *et al.*, 1986), o que influencia necessariamente as suas propriedades nutricionais e funcionais, condicionando desta forma a sua aplicação.

1.3 Propriedades funcionais das proteínas

As propriedades funcionais têm sido definidas como qualquer propriedade do alimento ou dos seus constituintes, excetuando as propriedades nutricionais, que influenciem a aceitação e utilização do produto alimentar (Schmidt, 1981).

As propriedades funcionais de uma proteína são determinantes para a sua utilização em formulação alimentar, afetando a conservação, armazenamento e aceitação pelos consumidores do produto alimentar. Estão relacionadas com as propriedades físicas, químicas e estruturais ou conformacionais da proteína. Estas propriedades incluem tamanho, forma, composição/sequência de aminoácidos, carga e sua distribuição, relação hidrofiliicidade/hidrofobicidade, conteúdo e tipo de estrutura secundária (hélices α, folhas β), organização da estrutura terciária e quaternária dos segmentos polipeptídicos, ligações cruzadas inter-intra cadeias polipeptídicas (por exemplo, pontes dissulfureto), rigidez ou flexibilidade da proteína em resposta a mudanças externas, ponto isoelétrico, interação com outros componentes do alimento (água, íons, hidratos de carbono, lípidos e proteínas) e também condições do meio, nomeadamente pH, força iônica e temperatura (Damodaran, 1989; Damodaran, 1997; Lakemond *et al.*, 2000).

Assim, resultante da estrutura heterogênea e da interação com outros componentes alimentares, as proteínas exibem um amplo espectro de propriedades funcionais, as quais podem ser classificadas em hidrofílicas, intermoleculares e interfásicas. As propriedades hidrofílicas (solubilidade, capacidade de hidratação e de retenção de água e viscosidade) dependem das interações proteína-água. As propriedades intermoleculares (precipitação, gelificação e formação de fibras) dependem da capacidade das interações proteína-proteína ou das moléculas de proteína com outros componentes. Já as propriedades interfásicas ou de superfície (tensão superficial, emulsificação e capacidade de formação de espuma) dependem da capacidade de interação das moléculas de proteína para formarem películas entre duas fases imiscíveis.

A elucidação sistemática das propriedades físico-químicas das proteínas, assim como o efeito das condições do meio nessas propriedades, são aspetos decisivos para a compreensão dos mecanismos moleculares associados às propriedades funcionais das proteínas. Por outro lado, várias metodologias têm sido desenvolvidas e aplicadas no sentido de ampliar, diversificar e melhorar as propriedades funcionais das proteínas. Duas dessas metodologias são a hidrólise enzimática e a aplicação da tecnologia de alta pressão. Estas técnicas e os seus efeitos nas propriedades funcionais das proteínas de soja serão abordados mais detalhadamente nos capítulos 4 e 5, respetivamente, desta tese.

Em virtude da sua importância a nível industrial e tendo em conta o objetivo deste trabalho, a revisão bibliográfica a seguir apresentada incide sobre a solubilidade, propriedades emulsionantes e capacidade gelificante das proteínas de soja. No entanto, esta última será mais aprofundada uma vez que foi a propriedade funcional mais explorada neste trabalho de investigação.

1.3.1 Solubilidade proteica

Praticamente todos os alimentos são sistemas hidratados nos quais a água é usualmente o componente maioritário. As interações proteína-água são extremamente importantes na aplicação de proteínas em sistemas alimentares pois afetam as características de

solubilidade, critério considerado essencial para as propriedades físico-químicas das proteínas (Damodaran, 1997).

O índice de solubilidade é uma propriedade funcional importante porque relaciona-se diretamente com outras características funcionais, como capacidade de formação de espuma, capacidade de gelificação, poder emulsionante e viscosidade.

A solubilidade de uma proteína é a manifestação termodinâmica do equilíbrio entre as interações proteína-proteína e proteína-solvente e está relacionada com o balanço hidrofília/hidrofobia da sua superfície, sendo solúveis em água quando as forças eletrostáticas repulsivas se sobrepõem às forças de natureza atrativa, nomeadamente interações hidrofóbicas. Assim, as características de solubilidade estão relacionadas com a composição da superfície da proteína e termodinâmica das interações com o solvente (Damodaran, 1997; Añón *et al.*, 2001).

De um modo geral, as características de hidrofobia e hidrofília da superfície da proteína são os fatores mais importantes que afetam a solubilidade.

A solubilidade proteica em solução aquosa é dependente do pH, temperatura, força iónica, concentração de proteína e outros componentes, como solventes orgânicos. No geral, as proteínas apresentam menor solubilidade a pH próximo ou igual ao seu ponto isoelétrico (*pI*). Nestas condições, a repulsão eletrostática diminui favorecendo as interações proteína-proteína. Quando o pH se afasta do seu *pI*, a solubilidade da proteína tende a aumentar já que se promovem as interações proteína-água. Por isso, as proteínas puras apresentam o comportamento em “V” de solubilidade *versus* pH (Damodaran, 1997; Wagner *et al.*, 2000). Força iónica ou presença de solventes orgânicos também afetam o comportamento da solubilidade das proteínas face a alterações de pH (Vojdani, 1996).

As proteínas de soja têm uma solubilidade mínima a pH 4 – 4.5, região do *pI*, e máxima solubilidade a pHs alcalinos. A solubilidade dos isolados de proteína de soja (IPS), obtidos em laboratório, com pHs ajustados para 3.25 e 8.0, antes da etapa de liofilização foi, respetivamente, 78 e 100 % (Puppo *et al.*, 1995). De um modo geral, o aumento da força iónica resulta no decréscimo da solubilidade devido às complexas interações tanto eletrostáticas como hidrofóbicas que se estabelecem entre as subunidades 7S e 11S das globulinas (Damodaran e Kinsella, 1982). Renkema *et al.* (2002) avaliaram a solubilidade de isolados proteicos a pHs e força iónica diferentes. Em água e em NaCl 0.2 mol/L, o IPS apresentou baixa solubilidade, a pH entre 4 e 5. Aumentando a concentração de NaCl para

0.5 mol/L, a solubilidade mínima foi registada a pH 3. Estes autores avaliaram ainda o efeito do aquecimento na solubilidade dos isolados proteicos em diferentes condições do meio tendo constatado que o efeito do tratamento térmico é dependente da força iónica e do pH: a solubilidade dos isolados, sem adição de sal, não foi afetada; contudo, na presença de NaCl 0.2 mol/L e a pH superior a 5, registou-se um aumento em cerca de 20 a 30 % no valor da solubilidade relativamente às amostras de isolados sem sal enquanto que no intervalo de pH entre 3 e 7 registou-se um decréscimo entre 10 e 30 %.

De um modo geral, com o aumento da temperatura até aproximadamente 40 ° ou 50 °C aumenta-se a solubilidade das proteínas. Dependendo do tempo de aquecimento e a temperaturas mais altas, a proteína desnatura. Na maior parte dos casos, a desnaturação proteica seguida de agregação diminui a solubilidade. Diferentes proteínas requerem distintas exposições ao calor para se desnaturarem.

Petrucelli e Añón (1994) constataram que o tratamento térmico a 98 °C de isolados proteicos de soja conduziu a uma perda muito significativa de solubilidade. Por outro lado, não observaram alterações significativas na solubilidade dos isolados aquecidos a 80 ° e a 92 °C durante 5 min. Estes autores avaliaram ainda o efeito do pH na influência do tratamento térmico na solubilidade dos isolados de soja e verificaram que a pH 9 ocorre, durante o tratamento térmico, maior desnaturação proteica para além da agregação, o que explica a elevada solubilidade comparada com a obtida a pH 7.

1.3.2 Propriedades emulsionantes das proteínas

De acordo com Wagner e Guéguem (1999), as propriedades emulsionantes das proteínas dependem basicamente de dois efeitos: (1) decréscimo substancial da tensão superficial devido à adsorção da proteína na interface água-óleo e (2) formação da barreira estrutural, eletrostática e mecânica capaz de opor-se à destabilização das gotículas emulsionadas.

A capacidade de emulsificação das proteínas depende de características físico-químicas como tamanho, composição e sequência de aminoácidos, conformação espacial, densidade de cargas e hidrofobia superficial (Kester e Richardson, 1984; Dickinson e Stainsby, 1988).

A hidrofobia superficial e solubilidade são os principais fatores determinantes da atividade emulsionante enquanto que a flexibilidade molecular das proteínas é importante para a estabilidade da emulsão (Nakai, 1983).

Comparando com outras proteínas vegetais, as proteínas de soja possuem boa capacidade emulsionante (Zayas, 1997).

De um modo geral, a capacidade de emulsificação das proteínas de soja aumenta com o aumento da solubilidade e diminui com o aumento da concentração proteica. As condições de emulsificação são ótimas em condições alcalinas e pobres na faixa de pH entre 5 e 6 (Liu, 1997). Em geral, a fração 7S apresenta melhor capacidade de emulsificação e estabilização da emulsão do que a globulina 11S (Liu, 1997).

1.3.3 Propriedades gelificantes das proteínas

A capacidade para formar gel, matriz que retém água ou outros ingredientes como açúcares, gordura e aromas, é uma das propriedades funcionais mais exploradas pela indústria alimentar (Gosal e Ross-Murphy, 2000).

Um gel pode ser definido como um sólido viscoelástico que, dependendo das circunstâncias, pode fluir como um líquido viscoso ou comportar-se como um sólido elástico (Horner, 1999).

O processo de gelificação de proteínas globulares é de grande importância prática e tem sido muito estudado nos últimos cinquenta anos. As propriedades de textura e as características sensoriais dos produtos alimentares estão associadas diretamente ao tipo de estrutura do gel formado durante o seu processamento. Do ponto de vista reológico, a gelificação é um fenómeno no qual uma solução viscosa transforma-se num sólido viscoelástico por um processo de agregação ramificada, ou seja, ocorrem ligações cruzadas progressivas de moléculas poliméricas via interações não covalentes e/ou covalentes. Uma vez formado o gel, o entrecruzamento prossegue, aumentando a sua rigidez com o tempo, até alcançar o estado de equilíbrio (Clark e Lee-Tuffnell, 1986; Renard *et al.*, 2006).

As propriedades físico-químicas das moléculas de proteína e as condições do meio (pH, temperatura, força iónica, concentração de proteína, polaridade e tipo de solvente)

influenciam o tipo de agregados formados (morfologia, tamanho e propriedades de superfície). A estrutura tridimensional do gel é resultante da relação entre a estrutura das partículas do gel, o mecanismo e os eventos decorrentes das modificações das partículas de proteína durante o pré-tratamento e os processos de desnaturação e agregação.

A gelificação envolve uma alteração no estado macroscópico da matéria correspondente à transição do estado de sol para gel. Do ponto de vista físico do polímero, a formação do gel ocorre por transição de um estado molecular desordenado na solução para um estado mais ou menos ordenado na rede tridimensional do gel. Os primeiros estágios da gelificação podem ser detetados pelas alterações na viscosidade da dispersão de proteína. Estas alterações na viscosidade estão associadas ao processo de desnaturação e agregação das moléculas proteicas (Phillips *et al.*, 1994; Durand *et al.*, 2002). A capacidade da proteína desnaturada em agregar-se relaciona-se com a estrutura e, por isso, depende da extensão e natureza da desnaturação da proteína (Foegeding *et al.*, 1995; Renkema *et al.*, 2002). Assim, as interações proteína-proteína e proteína-solvente são influenciadas pelos mesmos fatores que afetam o processo de gelificação, bem como o tipo e as propriedades dos géis (Totosa *et al.*, 2002). Estes fatores podem ser classificados, de acordo com Phillips *et al.* (1994), como intrínsecos e extrínsecos, e são descritos a seguir.

1.3.3.1 Fatores intrínsecos que influenciam o processo de gelificação

Os fatores intrínsecos a seguir descritos relacionam-se com a proteína: interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas/composição em aminoácidos, ligações covalentes (pontes dissulfureto) e massa molecular (Totosa *et al.*, 2002).

As interações eletrostáticas também conhecidas por forças de van der Waals, incluem as forças dipolo-dipolo e as forças de dispersão de London.

As interações eletrostáticas estabelecem-se entre espécies de carga elétrica, como dipolos ou iões, podendo ser atrativas ou repulsivas, dependendo das respetivas cargas. A magnitude ou distribuição de carga na proteína é governada principalmente pelo pH e/ou força iónica da solução aquosa ao redor da biomolécula. A sensibilidade das interações eletrostáticas ao pH e à força iónica permite a manipulação das interações entre as moléculas proteicas e, por conseguinte, um melhor controlo das propriedades funcionais (Kuipers *et al.*, 2005).

O contributo das interações eletrostáticas para a formação de um gel pode ser avaliado por determinação do efeito de desnaturantes que neutralizam as cargas, como por exemplo, cloreto de sódio e tiocianato de sódio.

As ligações de hidrogénio estabelecem-se entre eletrões desemparelhados existentes em átomos muito eletronegativos e átomos de hidrogénio de grupos vizinhos. Este tipo de ligação é bastante forte comparativamente com outros tipos de interação dipolo-dipolo, sendo por isso capaz de desencadear o alinhamento das moléculas nas quais estão presentes. O envolvimento das ligações de hidrogénio na formação de um gel pode ser facilmente comprovado pela fusão do gel a temperaturas elevadas. Para além disso, o aumento das estruturas em folha β durante a gelificação sugere uma contribuição geral das ligações de hidrogénio no referido processo (Allain *et al.*, 1999).

As interações hidrofóbicas desempenham um papel determinante na conformação e interação das moléculas proteicas em solução. Estas interações estabelecem-se entre segmentos não polares de polipéptidos adjacentes, quando estes resíduos, normalmente voltados para o interior da macromolécula, são expostos em consequência da desnaturação. Quando uma molécula não polar é introduzida em água, ela desencadeia um rearranjo das moléculas de água que se encontram na sua vizinhança alterando, principalmente, a entropia do sistema. A diminuição da entropia é termodinamicamente desfavorável e, consequentemente, o sistema tende a minimizar as áreas de contacto entre a água e os grupos apolares, gerando-se assim uma força atrativa entre os resíduos não polares. Os aminoácidos não polares agrupam-se formando um núcleo hidrofóbico envolvido por uma camada de resíduos polares em contacto com o solvente, o qual desempenha um importante papel na organização da proteína (Damodaran, 1997).

Assim, o carácter hidrofóbico de determinada proteína afeta o processo de formação da rede tridimensional e é determinante para as características dos géis obtidos.

As interações hidrofóbicas existentes entre moléculas proteicas podem ser desestabilizadas por adição de ureia. A ureia é normalmente utilizada para desnaturar proteínas embora o mecanismo ainda não esteja completamente esclarecido.

As pontes dissulfureto são ligações covalentes que se formam sob determinadas condições térmicas. O seu contributo para a formação do gel pode ser avaliado por adição de agentes redutores como o β -mercaptoetanol ou o ditioneitol (DTT) entre outros.

De acordo com Utsumi e Kinsella (1985), as pontes dissulfureto estão envolvidas na elasticidade dos géis mas não são essenciais para que ocorra a gelificação. O seu papel relaciona-se com a capacidade para aumentar a massa molecular média e o comprimento da cadeia por estabelecimento de ligações covalentes intermoleculares. As variações na formação da rede tridimensional e na rigidez do gel podem estar relacionadas com as diferenças na massa molecular e tamanho hidrodinâmico das cadeias polipeptídicas no gel (Totosaus *et al.*, 2002).

1.3.3.2 Fatores extrínsecos que influenciam o processo de gelificação

Os fatores extrínsecos relacionam-se com as condições do meio que envolvem a proteína, que podem ser controladas para conduzir ou melhorar a formação do gel, tais como: concentração de proteína, pH, temperatura, força iónica e tipo de sal. A variação destes fatores afeta o processo de formação do gel, a estrutura da rede tridimensional, as propriedades reológicas e a capacidade de retenção de água do gel formado, no caso da maior parte das proteínas, incluindo as proteínas de soja (Renkema, 2004).

A concentração da proteína é um fator importante na determinação do tipo de gel e nas suas características finais, principalmente as relacionadas com a textura. As ligações cruzadas entre as macromoléculas necessárias à gelificação proteica são proporcionais à concentração da proteína. A força do gel aumenta com o aumento da concentração proteica devido à formação de um maior número de ligações cruzadas (Hongsprabhas e Barbut, 1997a; Renkema, 2004). As interações proteicas intermoleculares ocorrem mais rapidamente em concentrações proteicas elevadas, dada a maior probabilidade de contactos intermoleculares (Phillips *et al.*, 1994).

A temperatura é um dos fatores mais importantes pois fornece a energia envolvida no processo de desdobramento da proteína e influencia as características do gel. A faixa de temperatura ótima para a gelificação, para proteínas globulares, é definida pela sua temperatura de desnaturação. O aquecimento excessivo a temperaturas superiores a 100 °C pode causar a rutura das ligações peptídicas nas proteínas, inibindo a formação do gel

(Damodaran, 1997). A temperatura para formação do gel deve ser selecionada de tal forma que permita um balanço entre a velocidade de desdobramento da proteína e o processo de agregação. Quando a velocidade de aquecimento é elevada, a primeira etapa da gelificação (desnaturação) é concluída mais rapidamente do que a segunda etapa (agregação). Para uma determinada taxa de desnaturação, a taxa de agregação é lenta, se as forças atrativas entre as cadeias proteicas desnaturadas forem fracas, resultando na formação de uma rede fina e num gel translúcido (Totosaus *et al.*, 2002).

A força iónica tem um efeito significativo na absorção de água, solubilidade das proteínas e na microestrutura do gel formado. A Figura 1.2 mostra a influência da força iónica e do pH nas propriedades finais de um gel proteico.

Para baixa força iónica (< 0.1 mol/L) ou para condições de pH afastadas do *pI* da proteína e para concentrações de proteína suficientemente elevadas, as forças eletrostáticas repulsivas impedem a ocorrência de agregação desordenada, formando-se assim, géis transparentes filamentosos. Sob condições de forças iónicas maiores (> 0.1 mol/L) a matriz torna-se mista, com os dois tipos de estrutura, ordenada e ao acaso (Foegeding *et al.*, 1995; Renkema *et al.*, 2002).

Relativamente ao tipo de sal, vários trabalhos comprovaram que os sais mono e divalentes reduzem as repulsões eletrostáticas entre os filamentos de proteínas carregadas eletricamente, promovendo assim a agregação das moléculas proteicas (Bryant e McClements, 1998; Totosaus *et al.*, 2002; Alting *et al.*, 2003).

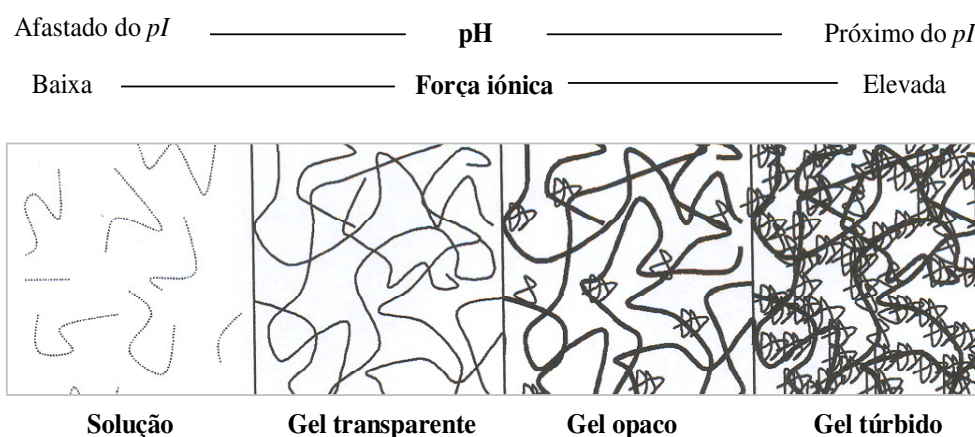


Figura 1.2 - Efeito do pH e da força iónica na estrutura e aparência dos géis. *Adaptado de Alting (2003)*

1.3.3.3 Mecanismos de gelificação de proteínas globulares

A gelificação de proteínas globulares pode ser induzida por diferentes fatores. A gelificação induzida pelo aumento da temperatura é o mecanismo mais frequente e mais vulgarmente estudado na área alimentar uma vez que é responsável pela estrutura de uma grande parte dos alimentos diários que consumimos. Um outro método, embora menos frequente, consiste na indução física da gelificação, por aplicação de pressão hidrostática. Para estes dois métodos, a desnaturação das moléculas proteicas e a subsequente agregação ocorrem num único passo.

No entanto, outros mecanismos de gelificação são possíveis: gelificação induzida por adição de sais, indução ácida e enzimática (Totosaus *et al.*, 2002).

Quer a indução ácida, quer a indução por adição de sais, consistem em duas etapas não simultâneas, uma vez que a adição direta do ácido ou do sal, normalmente, não resulta na formação de uma rede tridimensional pelo que a etapa de gelificação tem que ser precedida por uma etapa de “ativação”, na qual as moléculas proteicas desnaturam e formam agregados solúveis. Este processo designa-se habitualmente por gelificação a frio e tem sido alvo de interesse da comunidade científica e industrial uma vez que permite explorar e diversificar a aplicação das proteínas como ingredientes funcionais. Através deste método é possível manipular as propriedades do sistema previamente à etapa de gelificação para além de ser possível incorporar compostos termolábeis na matriz proteica, como por exemplo, vitaminas. O processo de formação de géis a frio ocorre em duas etapas (Figura 1.3): primeiro, as proteínas são convertidas em pequenos agregados solúveis através de um aquecimento brando da solução de proteína, com baixa concentração, e em condições que não produzem gel (baixa força iónica e pH diferente do *pI*) (Hongsprabhas e Barbut, 1997b; Bryant e McClements, 2000).

Com o arrefecimento da solução, os agregados formados permanecem solúveis e não ocorre a formação de gel devido à predominante repulsão eletrostática entre estes agregados. A gelificação pode ser posteriormente induzida, a temperatura baixa ou ambiente (Bryant e McClements, 2000), por alterações na qualidade do solvente, como mudanças de pH ou adição de sais como cloreto de cálcio (Maltais *et al.*, 2005; 2008) ou cloreto de sódio (Puyol *et al.*, 2001). Ocorre então o processo de interação entre os agregados, formados no pré-tratamento térmico, culminando na formação de um gel.

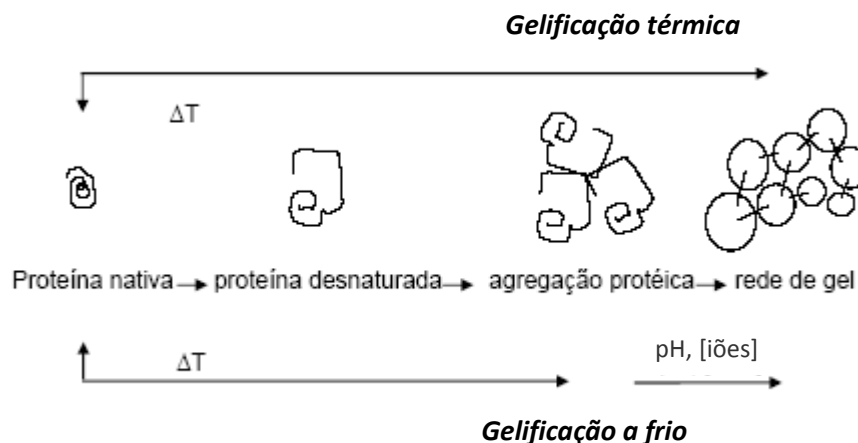


Figura 1.3 – Esquema da conversão de proteínas nativas numa rede proteica (gel) de acordo com o processo de indução térmica e/ou indução a frio. *Adaptado de Alting (2003).*

Apresenta-se de seguida uma descrição mais pormenorizada da gelificação induzida termicamente pois foi o mecanismo estudado durante este trabalho.

O processo de produção de géis induzidos termicamente a partir de uma solução proteica, apesar de complexo, pode ser resumido em duas etapas: a primeira é a transformação irreversível do estado de sol para pró-gel, que ocorre com o aquecimento da solução. A desnaturação da proteína promovida pelo calor está associada a alterações conformacionais que favorecem as interações intermoleculares entre as moléculas de proteína, conduzindo ao estado de pró-gel (Foegeding *et al.*, 1995; Renkema e van Van Vliet, 2002). Nesta fase, ocorre a rutura das pontes de hidrogénio, diminuição das interações eletrostáticas, enfraquecimento das interações intermoleculares e estabilização de interações hidrofóbicas. Após o aquecimento, o aumento significativo da hidrofobicidade é uma indicação do desdobramento da proteína, e quanto mais locais hidrofóbicos estiverem expostos maior a possibilidade de interação entre eles causando a agregação das moléculas de proteína (Yamauchi *et al.*, 1991).

A segunda etapa é a conversão reversível do pró-gel em gel que ocorre no arrefecimento da suspensão proteica e depende do tipo de agregação entre as subunidades da proteína resultando numa rede tridimensional. A segunda etapa deverá ser mais lenta do que a primeira, de forma a permitir o desenvolvimento de uma rede tridimensional bem organizada. Durante o arrefecimento, as proteínas desnaturadas podem retomar à sua conformação inicial. Contudo, a desnaturação parcial da proteína pode diminuir a

disponibilidade do número de grupos funcionais reativos para estabelecer ligações intermoleculares e assim comprometer a formação de uma rede de gel autossustentável (Damodaran, 1988; Mangino, 1992; Damodaran, 1997).

Na Figura 1.4 pode-se observar o esquema das etapas principais para a gelificação térmica de proteínas globulares (Totosa *et al.*, 2002). A velocidade de aquecimento e/ou tempo de aquecimento afetam a desnaturação e parecem influenciar o tipo de agregado proteico formado (Foegeding *et al.*, 1986).

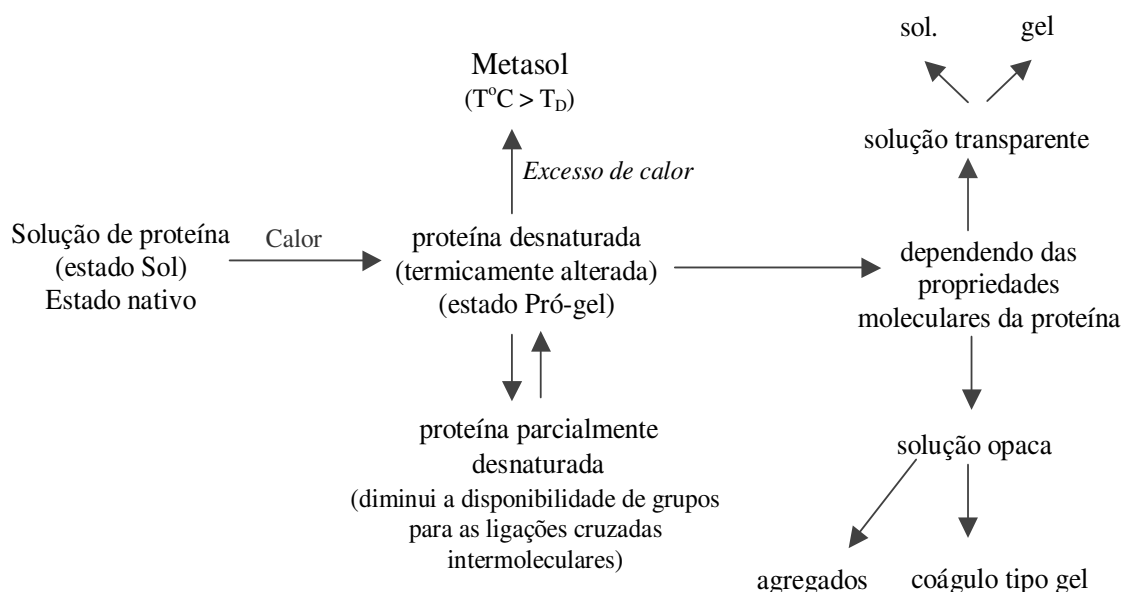


Figura 1.4 – Esquema de gelificação de proteínas globulares induzida pelo calor. Adaptado de Totosa *et al.* (2002). T- temperatura; T_d - temperatura de desnaturação

Os géis de proteínas globulares podem ser formados a partir de dois mecanismos de agregação (Hermansson, 1994): Agregação ao acaso (Figura 1.5 A) e agregação linear (em fio de contas) (Figura 1.5 B). Estes dois mecanismos originam géis com estruturas distintas, géis com estrutura grosseira (particulada) e géis de cadeia filamentar, respetivamente.

Quando a repulsão entre as moléculas de proteína é grande, formam-se agregados lineares, enquanto que se pequena, quando o pH está próximo do pI , formam-se agregados globulares ao acaso (Gosal e Ross-Murphy, 2000).

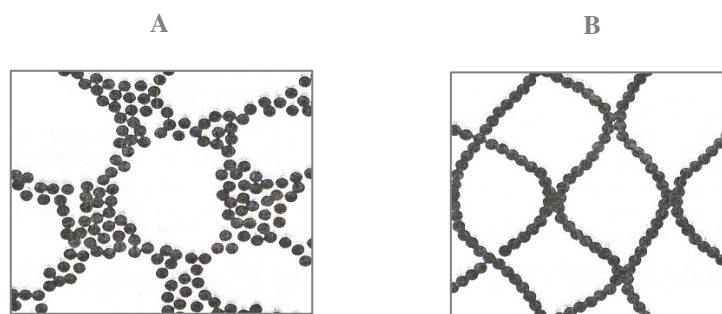


Figura 1.5 - Estrutura da rede macromolecular tridimensional resultante de diferentes tipos de agregação das proteínas globulares: (A) agregação das moléculas ao acaso – gel com estrutura particulada; (B) agregação em fio de contas- gel de cadeia filamentar.

Em géis de cadeia filamentar as proteínas estão unidas umas às outras como num colar de pérolas. Esse tipo de gel é geralmente transparente, indicando que os agregados proteicos no gel são menores que 50 nm.

Géis de rede grosseira são opacos, esbranquiçados e são formados por agregação ao acaso das proteínas. Como referido anteriormente, a maior parte dos géis de proteínas globulares pode adquirir ambas as formas de rede tridimensional dependendo das condições de gelificação, nomeadamente da concentração de proteína, pH, força iónica, temperatura e do tempo de aquecimento (Hermansson, 1986).

1.3.3.4 Gelificação térmica de isolados de proteína de soja

A gelificação térmica dos IPS tem sido tema de estudo de vários investigadores (Petrucelli e Añón, 1995; Puppo *et al.*, 1995; Chronakis, 1996; Hsua, 1999; Renkema *et al.*, 2002; Renkema e van Van Vliet, 2002; Renkema, 2004; Hua *et al.*, 2005) em virtude das vantagens da aplicação destes isolados na indústria alimentar.

Informações encontradas na literatura sobre IPS mostram a existência de diferenças significativas nas propriedades gelificantes resultantes, sobretudo, da variabilidade da composição dos isolados, das condições de processamento durante a produção do isolado e das condições do processo de gelificação (Puppo *et al.*, 1995; Renkema e van Van Vliet, 2002; Renkema *et al.*, 2002; Renkema 2004; Hua *et al.*, 2005).

As duas frações proteicas da soja mais importantes, β -conglícinina e glicínina, apresentam diferenças funcionais consideráveis no que se refere à capacidade de gelificação. Utsumi e Kinsella (1985) demonstraram que os géis de proteína de soja apresentam rigidez superior

à observada em géis obtidos com a fração 7S e 11S isoladamente. A fração 11S forma géis mais fortes do que a fração 7S (Yao *et al.*, 1988), principalmente a pH 7.6 (Renkema *et al.*, 2001), possivelmente devido à presença de um maior número de grupos SH.

A fração 11S requer tratamento térmico mais intenso do que a fração 7S para a formação do gel. Como já foi referido, o intervalo de temperatura ótima para a gelificação relaciona-se com a temperatura de desnaturação proteica. Resultados de Lakemond *et al.* (2000) corroboram os resultados de calorimetria obtidos por Danilenko *et al.* (1987), onde se constatou que a temperatura de desnaturação da glicinina (11S) inicia-se por volta dos 80-90 °C e a da β -conglucina (7S), por volta dos 60-70 °C.

Renkema *et al.* (2001) demonstraram ainda que, apesar da diferente eficiência de gelificação, as frações 7S e 11S apresentam, sensivelmente, a mesma concentração crítica de gelificação. Por outro lado, os resultados obtidos mostram que a mistura das duas frações resulta na melhoria das propriedades gelificantes a pH 3.8 e na redução da dispersibilidade a pH 7.6.

Existem já muitos trabalhos realizados sobre o efeito do pH, força iónica e concentração proteica na gelificação térmica de IPS. Na realidade, o conhecimento da influência destes parâmetros, facilmente manipuláveis e alteráveis, permite prever, diversificar e melhorar as propriedades finais dos géis obtidos.

Puppo *et al.* (1995) estudaram o efeito do pH e da concentração proteica na gelificação de IPS obtidos em condições ácidas e a pH 8.0. Os resultados mostraram que os dois isolados, ácido e a pH 8.0, apresentaram solubilidade elevada e composição proteica semelhante. Por outro lado, extratos proteicos dos dois tipos de géis (ácido e pH 8) revelaram diferenças nos perfis electroforéticos, demonstrando assim, em função do pH, o envolvimento de diferentes frações para a formação do gel. A solubilidade dos géis, em água destilada, diminuiu com o aumento da concentração proteica; contudo, nos tampões a pH 8 e pH 8-SDS-ureia, não foi afetada pela concentração. Dependendo do pH, diferentes interações intermoleculares contribuem para a manutenção e estabilização da estrutura dos géis. Para géis ácidos, as ligações não covalentes prevaleceram, tendo-se verificado que ligações dissulfureto não contribuíram para a estabilização dos géis a este pH, enquanto que nos géis a pH 8 foram estas interações que dominaram.

Renkema *et al.* (2002) também avaliaram o efeito do pH na gelificação de IPS. Este trabalho veio comprovar, mais uma vez, que a desnaturação térmica é um pré-requisito para a formação do gel de proteínas de soja, em todas as condições de pH (3.8, 5.2 e 7.6) e força iônica (NaCl 0, 0.2 e 0.5 mol/L) estudadas. Os resultados demonstraram que os géis formados a pH > 6 são menos rígidos, observando-se o aumento da rigidez com a progressiva diminuição do pH. Esta observação foi relacionada, com base nos resultados da composição proteica da fração solúvel, determinada por SDS-PAGE, com os diferentes graus de associação/dissociação das proteínas de soja durante o aquecimento em função do pH. No intervalo de pH entre 3 e 5 todas as proteínas parecem ter participado na formação da rede de gel enquanto a pH superior a 5 menos proteína, especialmente polipéptido ácido, integrou a rede. Esta observação coincidiu com a diminuição da rigidez do gel. A pH 7.6 registaram-se rearranjos da estrutura do gel durante o aquecimento prolongado, o que não aconteceu a pH 3.8.

Foi ainda avaliado o efeito combinado do pH e da força iônica na rigidez dos géis de IPS. Em todas as concentrações de sal estudadas (NaCl 0, 0.2 e 0.5 mol/L), os géis apresentaram maior rigidez a pHs mais baixos. Na ausência de sal, G' atingiu o valor máximo a pH 6.5.

A temperatura de desnaturação também depende fortemente do pH e da força iônica (Hermansson, 1986; Damodaran, 1988; Renkema *et al.*, 2002; Speroni *et al.*, 2010). Renkema *et al.* (2002) mostraram que a temperatura de desnaturação foi tanto maior quanto mais próximo o pH do pI das proteínas de soja e maior a força iônica. A adição de sal permitiu estabilizar a estrutura quaternária das proteínas de soja aumentando, por isso, a temperatura de desnaturação das proteínas (Hermansson, 1986). Quando as proteínas começam a desnaturar, o sal diminui as repulsões eletrostáticas entre as cadeias polipéptídicas, favorecendo a interação entre elas e, conseqüentemente a formação de uma rede proteica, a temperaturas inferiores às registadas sem adição de sal, mesmo quando as proteínas não estão completamente desnaturadas (Speroni *et al.*, 2010).

Em termos de gelificação, a pH inferior a 6, a temperatura de gelificação do IPS foi inferior e coincidiu com a temperatura de desnaturação da β -conglícinina enquanto que a pH superior a 6, a temperatura de gelificação aumentou, passando a coincidir com a temperatura de desnaturação da glicínina.

Como esperado pelo acima discutido, as propriedades reológicas do gel final são influenciadas pela concentração proteica e características do meio (solvente, pH, força iônica) mas dependem também das características do tratamento térmico aplicado, nomeadamente da velocidade e temperatura máxima de aquecimento, assim como do tempo que o sistema permanece a essa temperatura máxima.

De acordo com Renkema e van Vliet (2002), a força dos géis proteicos de soja, medida pelo módulo de armazenamento, aumentou na proporção da proteína desnaturada. O aumento de G' foi também observado durante o aquecimento prolongado a 90 °C, tendo sido explicado pela ocorrência de uma reorganização estrutural da rede do gel e, possivelmente, pela inclusão de maior quantidade de proteína na rede.

Os resultados deste trabalho permitiram relacionar o aumento da temperatura máxima de aquecimento com o aumento do grau de desnaturação proteica. Por outro lado, à taxa de aquecimento 1 K/min, o processo de gelificação iniciou-se a uma temperatura inferior à registada a 5 K/min e resultou no decréscimo da temperatura de desnaturação das proteínas. Assim, os resultados demonstraram que a desnaturação é um pré-requisito para a gelificação. O aumento de G' após o arrefecimento foi termo-reversível, indicando que a formação de pontes dissulfureto e o arranjo estrutural não ocorreram após o arrefecimento. Os géis dos isolados de soja são estabilizados principalmente por agregados formados entre as subunidades α' , α e β -7S e o polipéptido A-11S (Utsumi e Kinsella, 1985).

Nos géis de isolados de proteínas de soja ou de glicinina, as pontes dissulfureto estão envolvidas no processo de gelificação, ao contrário dos géis obtidos com β -conglícinina. No entanto, nos três sistemas (isolado de soja, glicinina e β -conglícinina) as interações não covalentes como as interações hidrofóbicas e pontes de hidrogénio têm um papel importante no processo de gelificação (Renkema e van Vliet, 2002; Speroni *et al.*, 2010). A presença de sais intensifica o papel das interações hidrofóbicas entre moléculas de proteína durante a fase de aquecimento (Scilingo e Añón, 2004; Speroni *et al.*, 2010).

Curiosamente, nos últimos tempos, poucos trabalhos têm sido realizados sobre a organização conformacional das frações proteicas nos géis de IPS.

Wang e Damodaran (1991) avaliaram a influência da conformação da proteína na força do gel utilizando dicroísmo circular e punção uniaxial do gel. Na gama de concentrações estudadas (8 a 13 %), verificou-se que nas soluções de IPS aquecidas a temperaturas

superiores à temperatura de desnaturação e arrefecidas a 4 °C, as proteínas recuperaram as suas estruturas secundárias. Os resultados permitiram ainda inferir que estruturas em folha β estavam envolvidas no processo de agregação e na formação da rede de gel das proteínas de soja. Informações baseadas em espectroscopia de Infravermelho e de Raman (Wang e Damodaran, 1991) sugeriram que as estruturas em folha β são essenciais para as interações proteína-proteína e consequentemente para a força do gel. As ligações de hidrogénio intermoleculares entre folhas β paralelas e antiparalelas funcionam como zonas de junção que estabilizam a rede de gel.

O tipo de estrutura de rede tridimensional formada durante a gelificação contribui para as características de textura e capacidade de reter água, gordura e outros componentes. Embora se saiba que a microestrutura do gel está fortemente relacionada com as propriedades funcionais, ainda muito existe para entender sobre a estrutura do gel, especialmente a nível coloidal, supramolecular e sobre a relação estrutura-função. Neste sentido, alguns trabalhos têm vindo a ser realizados na tentativa de colmatar e aprofundar esta área do conhecimento.

Renkema *et al.* (2001) e Renkema (2004) avaliaram a relação entre textura e microestrutura de géis de IPS e de glicinina em soluções de NaCl 0, 0.2 e 0.5 mol/L, a pH 7.6, 5.2 e 3.8. A estrutura e o mecanismo de formação do gel de glicinina e do isolado de soja foram diferentes a pH 7.6 e 3.8. A pH 7.6, os géis formados foram mais uniformes e levemente opacos consistindo essencialmente em agregados pequenos, com rede de filamentos finos e pequenos poros. A nível reológico, o módulo de armazenamento foi relativamente baixo ($G' \approx 1000$ Pa) e a força de rutura intermédia (0.79). Os géis obtidos a pH 3.8, ao contrário, apresentaram uma estrutura mais grosseira, esbranquiçada, com agregados de maiores dimensões, filamentos mais grossos e poros de maiores dimensões. G' atingiu valores superiores (15000 a 20000 Pa) aos registados a pH 7.6 e baixa força de rutura (0.28).

Puppo e Añón (1998) demonstraram que géis de isolados proteicos de soja a pH 3.5 apresentaram-se menos transparentes e com microestrutura mais agregada e menos homogénea do que a pH 2.75 ou pH 8.0. Os géis ácidos de isolados de soja em NaCl 0.5

mol/L, obtidos por aquecimento, apresentaram-se mais opacos e com estrutura mais aberta e mais frágil do que os géis obtidos nas mesmas condições mas sem adição de NaCl.

1.4 Sistemas mistos proteínas-polissacarídeos

Os produtos alimentares podem ser considerados sistemas multicomponentes, em que um ou mais biopolímeros (gelificantes ou não) neles existem naturalmente ou são incorporados no sistema para melhorar as características de textura (Morris e Wilde, 1997).

As interações que ocorrem entre proteínas e polissacarídeos são interessantes para diversificar e melhorar algumas das propriedades funcionais de cada biopolímero sendo, por isso, bastante utilizadas na indústria alimentar.

Os polissacarídeos são macromoléculas formadas por monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas. As moléculas dos polissacarídeos podem ser lineares ou ramificadas e com a variação do grau de ramificação ocorrem alterações importantes nas propriedades destes biopolímeros em solução, afetando a solubilidade, viscosidade e gelificação. A solubilidade destes compostos é geralmente afetada pelo pH e por iões ou agentes complexantes. As soluções destes polímeros apresentam normalmente elevada viscosidade e esta propriedade é influenciada pelo tamanho da macromolécula, forma e conformação (Stephen e Churms, 1995). Os polissacarídeos solúveis são amplamente utilizados nas indústrias alimentares pois atuam como espessantes e estabilizantes devido à sua capacidade de aumentar a viscosidade dos produtos nos quais são adicionados, influenciando assim as propriedades dos alimentos, como aparência e textura.

O efeito de determinado biopolímero depende não só das suas propriedades individuais, mas também, das interações que pode estabelecer com outros biopolímeros e/ou outros componentes do alimento. Torna-se fundamental, por isso, compreender a interação entre os diferentes componentes alimentares, nomeadamente entre proteínas e polissacarídeos.

1.4.1 Interações entre proteínas e polissacarídeos

Misturas de proteínas e polissacarídeos são, atualmente, muito aplicadas na indústria alimentar uma vez que podem constituir novos ingredientes alimentares, particularmente

como substituintes de gorduras (Eleya e Turgeon, 2000), para além de desempenharem um papel determinante na estrutura, textura e estabilidade de muitos produtos alimentares (Doublier *et al.*, 2000; Hemar *et al.*, 2001).

O mecanismo de formação da estrutura dos alimentos é principalmente determinado pela natureza e intensidade das interações entre os biopolímeros que os constituem. Assim, quando soluções de dois biopolímeros diferentes são misturadas, três situações podem ocorrer (Syrbe *et al.*, 1998) (Figura 1.6):

- (i) *Cossolubilidade ou miscibilidade*: O sistema é homogéneo e os biopolímeros estão distribuídos no solvente. Esta situação é muito rara (Tolstoguzov, 1991).
- (ii) *Complexação ou associação*: Ocorre se as interações entre os biopolímeros forem favoráveis (polianião-policatião). Como resultado, forma-se um sistema de duas fases no qual uma fase é constituída pelos dois biopolímeros presentes em elevadas concentrações enquanto que a outra fase é composta principalmente pelo solvente (sinereze).
- (iii) *Incompatibilidade termodinâmica*: É a situação mais comum (Morris e Wilde, 1997). Ocorre quando as interações entre os diferentes biopolímeros são repulsivas e/ou quando os dois tipos de polímeros apresentam diferente afinidade em relação ao solvente (Tolstoguzov, 1991). O comportamento da mistura resulta num sistema bifásico, onde cada fase é rica num dos polímeros. A incompatibilidade termodinâmica é fortemente influenciada pelo pH, força iónica, conformação, densidade de carga e a concentração dos biopolímeros (Tolstoguzov, 1991).

O efeito do pH no comportamento da mistura proteína-polissacarídeo, em solução, depende da natureza do polímero, ou seja, se é neutro ou carregado eletricamente. Neste último caso, também depende do grupo iónico do polissacarídeo (Gringberg e Tolstoguzov, 1997). No sistema com proteína e polissacarídeo aniónico (carboxilado ou sulfatado), o pH tem um efeito na autoassociação das proteínas e também na associação entre proteína e polissacarídeo (Syrbe *et al.*, 1998). O complexo coacervado é observado a pHs inferiores ao *pI* das proteínas, onde os dois biopolímeros (proteína e polissacarídeo) possuem cargas opostas. A valores de pH superiores ao *pI* das proteínas, ambos os polímeros possuem cargas predominantemente negativas.

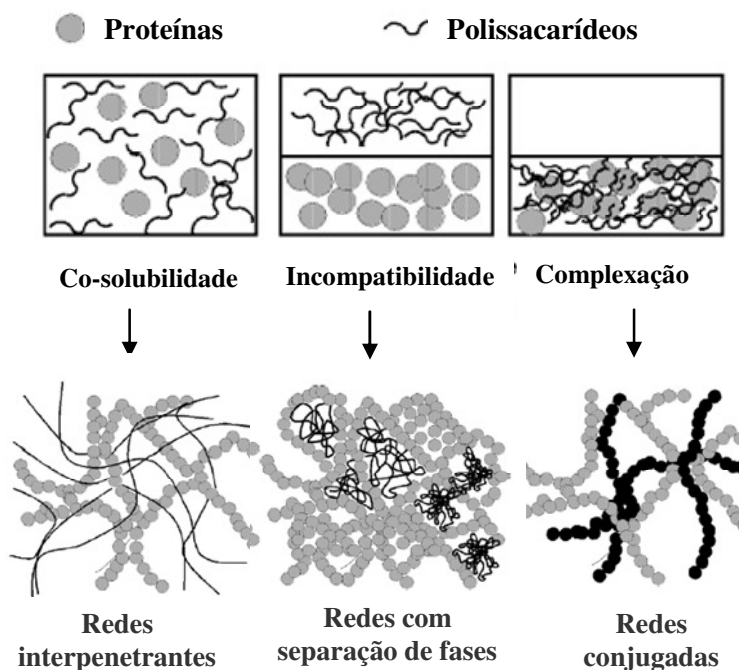


Figura 1.6 – Esquema de misturas de biopolímeros e respectivo tipo de rede obtido. *Adaptado de Morris (1998)*

1.4.2 Gelificação de sistemas mistos proteínas de soja-polissacarídeos

Uma crescente atenção tem sido dada à gelificação de misturas aquosas de proteínas e polissacarídeos durante as últimas décadas. Esta tendência reflete (i) o papel fundamental dos hidrocolóides na formação de estruturas em alimentos, (ii) um progressivo aumento na utilização de proteínas e polissacarídeos como aditivos e (iii) o desenvolvimento de novos métodos de processamento.

Um considerável número de investigadores tem-se dedicado ao estudo da influência de polissacarídeos nas propriedades funcionais e, mais concretamente, nas propriedades gelificantes das proteínas de soja. Os trabalhos realizados utilizaram quer isolados proteicos comerciais (Sánchez *et al.*, 1995; Hua *et al.*, 2003; Ortiz *et al.*, 2004; Braga *et al.*, 2006; Cavallieri *et al.*, 2010) quer concentrados proteicos (Li *et al.*, 2007; Jeng-Yune *et al.*, 2007) ou frações individuais (Lakemond *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2009).

De um modo geral, k-carragenina (k-car) (Ipsen, 1995; Hua *et al.*, 2003; Ortiz *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2008b; Cavallieri *et al.*, 2010) e goma xantana (GX) (Sánchez *et al.*, 1995; Hua *et*

al., 2003; Braga *et al.*, 2006) têm sido os polissacarídeos mais estudados em géis mistos com proteínas de soja.

A melhoria da textura e da viscoelasticidade dos géis de IPS foi observado como resultado do efeito sinérgico entre as proteínas de soja e carrageninas (Ipsen, 1995; Baeza *et al.*, 2002; Hua *et al.*, 2003; Ortiz *et al.*, 2004; Cavallieri *et al.*, 2010). De um modo geral, todos estes trabalhos comprovaram também que a adição de carrageninas aumentou a estabilidade térmica das globulinas 7S e 11S.

Hua *et al* (2003) avaliaram o efeito da presença de diferentes polissacarídeos (k-car, GX, goma de alfarroba e misturas GX-GA) nas propriedades viscoelásticas dos géis de proteína de soja. As diferentes combinações de biopolímeros resultaram em géis com rigidez variável, o que foi atribuído ao diferente mecanismo de interação proteína-polissacarídeo. As gomas gelificantes estudadas (k-car e LBG-GX) demonstraram diferente capacidade para formar a fase contínua da mistura, relacionando-se com as propriedades gelificantes de cada goma individualmente e sua afinidade para o solvente. A GX, mesmo à concentração de 1 %, comportou-se sempre como fase dispersa, ao passo que a 0.6 % de k-car, a fase contínua passou a ser formada pelo polissacarídeo. Este comportamento foi relacionado com a maior capacidade gelificante da k-car quando comparada com a GX. Por outro lado, a 0.4 % de k-car e variando a concentração de IPS entre 6 e 9%, o polissacarídeo constituiu a fase contínua, observando-se uma inversão de fases para concentrações proteicas superiores a 9 % (Hua *et al.*, 2003). Para além disso, o aumento da concentração de k-car ou de GX resultou no aumento do módulo de armazenamento (G') dos géis mistos destes polissacarídeos com proteína de soja.

Sendo as GM polissacarídeos neutros, a fase contínua dos sistemas mistos IPS/GM não é formada pelo polissacarídeo, sendo as propriedades reológicas destes sistemas o reflexo do comportamento reológico das proteínas de soja (Hua *et al.*, 2003). Para baixas concentrações dos biopolímeros, um decréscimo da rigidez dos sistemas IPS/GA foi descrito no trabalho de Hua *et al.* (2003), comparativamente com o esperado por previsão teórica, o qual foi relacionado com as baixas concentrações efetivas dos biopolímeros em consequência do *demixing* incompleto.

Durante o arrefecimento dos sistemas mistos, o decréscimo da temperatura favoreceu a separação de fases e, simultaneamente, a formação de estruturas ordenadas, agregação e/ou

gelificação das misturas dos biopolímeros. Contudo, tendo em conta a conformação desordenada adotada pelas moléculas de GA em solução, o arrefecimento das misturas IPS/GA não promoveu a formação significativa de estruturas ordenadas de GA. Embora a GA não tenha apresentado um efeito significativamente positivo na gelificação do IPS (Hua *et al.*, 2003), quando se adicionou GX ao sistema IPS-GA, formou-se um gel forte resultante da interação sinérgica entre os biopolímeros.

O efeito da adição de GM na gelificação de proteínas de soja foi também estudado por Zhu *et al.* (2009). Os resultados deste trabalho mostraram que a goma de guar (GG) promoveu a agregação da β -conglícinina, desnaturada termicamente, favorecendo a rigidez dos géis finais obtidos, predominantemente formados por ligações não covalentes. A presença de GG, em concentrações a variar entre 0.05 e 0.5 %, resultou num aumento do valor de G' comparativamente com o sistema contendo apenas β -conglícinina, sendo este efeito tanto maior quanto maior a concentração do polissacarídeo.

A adição de carrageninas a proteínas de soja resultou num aumento da velocidade de gelificação e maior viscoelasticidade dos géis obtidos (Ortiz *et al.*, 2004) bem como na diminuição da temperatura de gelificação (Cavallieri *et al.*, 2010). O aumento de G' com a concentração de k-car foi também reportado por estes autores e corroborou o trabalho de Hua *et al.* (2003). A presença de car permitiu obter géis, a pH 8, mesmo a concentrações proteicas inferiores à concentração crítica de gelificação do IPS (6 %) (Ortiz *et al.*, 2004). Baeza *et al.* (2002) demonstraram o efeito sinérgico do IPS na gelificação da k-car e constatarem que este efeito foi tanto mais intenso quanto maior o grau de desnaturação das proteínas de soja. Cavallieri *et al.* (2010) comprovaram que existe um efeito competitivo entre a agregação proteica induzida termicamente e a separação de fases entre as proteínas de soja e a carragenina devido à incompatibilidade termodinâmica a pH neutro. Os resultados de microscopia confocal de varrimento de laser (CLSM) evidenciaram que o aumento da concentração dos biopolímeros levou à formação de uma estrutura mais rígida embora descontínua como resultado da separação de fases.

O efeito da adição da k-car a isolados pré-aquecidos foi também avaliado (Li *et al.*, 2008b). Os resultados de CLSM deste trabalho mostraram que a concentração de k-car necessária à separação de fases diminuiu com o aumento do tamanho dos agregados. O tratamento térmico das proteínas de soja favoreceu a incompatibilidade entre os

biopolímeros, mesmo a baixas concentrações (1 % IPS e 0.2 % de k-car). A inversão de fases, normalmente observada nas misturas IPS-k-car, foi também visualizada nos sistemas contendo o IPS pré-aquecido existindo, em todas as proporções de mistura estudadas, dois componentes macromoleculares distribuídos em duas fases separadas. A depleção das cadeias de k-car, apontada como uma possível causa para a separação de fases, resultou numa associação efetiva entre os agregados de proteínas de soja e numa microestrutura mais heterogênea. Assim, a tendência dos resultados revelou que para as misturas IPS/k-car, a pH 7 e 0.1 mol/L NaCl, embora a separação de fases por incompatibilidade termodinâmica não possa ser descartada, o fenómeno de depleção-floculação foi apontada como principal causa da separação de fases. Estes autores demonstraram a forte competição entre a separação de fases e a gelificação.

A interação entre proteínas de soja e goma xantana, em função da concentração de KCl em géis mistos a pH 3, foi estudada por Braga *et al.* (2006). Os resultados indicaram que os géis IPS-GX preparados sem adição de KCl eram predominantemente estabilizados por ligações não covalentes (ligações de hidrogénio e interações hidrofóbicas) e pontes S-S enquanto nos géis obtidos com adição de sal, as interações eletrostáticas estavam também envolvidas na estabilização do gel. A pH 3 todas as subunidades das globulinas 7S e 11S participaram na formação do gel embora se associassem de forma diferente em função da presença ou não de KCl. A subunidade β -7S foi provavelmente a fração electrostaticamente ligada à GX, o que diminuiu a quantidade de GX e desta subunidade na rede proteica principal, induzindo a diminuição da rigidez do gel na ausência de KCl. Os diferentes valores obtidos das propriedades mecânicas após adição da GX e/ou KCl relacionaram-se com a microestrutura do gel, a qual que se tornou mais grosseira.

O efeito da força iónica na gelificação térmica e na separação de fases de misturas IPS e dextrano, um polissacarídeo neutro, foi avaliado por Li *et al.* (2008a; 2009). O aumento da força iónica acelerou o processo de agregação proteica e diminuiu a compatibilidade entre os agregados de proteínas de soja e o dextrano como foi visível pelos diagramas de fase construídos. Além disso, os agregados proteicos formados na presença de NaCl mostraram ter maior incompatibilidade com o dextrano do que os agregados formados na ausência do sal. Assim, a separação de fases segregativa de agregados de proteínas de soja/dextrano foi favorecida pela adição de sal. O tempo de gelificação dos sistemas mistos foi menor na presença de sal. Os módulos viscoelásticos aumentaram com o aumento da força iónica.

Curiosamente, os valores de G' e G'' das misturas IPS-NaCl/dextrano foram menores do que os registados para os sistemas IPS/dextrano, tendo os autores, com base em trabalhos anteriores, relacionado esta constatação com o aumento do tamanho das partículas e/ou diminuição do número de pontos de contacto entre moléculas proteicas.

O tipo de efeito provocado pela adição das gomas às proteínas de soja mostrou ser dependente da concentração (Sánchez *et al.*, 1995; Zhu *et al.*, 2009; Cavallieri *et al.*, 2010; Salazar-Montoya *et al.*, 2012) e do tipo de polissacarídeo (Sánchez *et al.*, 1995): o aumento da concentração da GA de 1 para 3 g/Kg permitiu que interações inicialmente antagonistas se tornassem sinérgicas com intensidade crescente à medida que aumentou a concentração de polissacarídeo. Por outro lado, a interação entre proteína de soja e misturas de GX e GG (1:1) resultou num efeito sinérgico traduzido no aumento do coeficiente de consistência (k), da viscosidade aparente e da tensão de inércia. Contudo, as proteínas de soja apresentaram uma interação antagonista com misturas GX/GA (2 g/Kg) diminuindo as propriedades de gel do sistema, com uma redução da tensão de inércia e um decréscimo acentuado dos valores de k e da viscosidade aparente. Zhu *et al.* (2009) constataram que o aumento da concentração da GG de 0.05 para 0.5 % aumentou a temperatura de desnaturação da β -conglícinina como resultado da incompatibilidade termodinâmica com o polissacarídeo favorecendo assim a agregação das moléculas proteicas desnaturadas. Por outro lado, a concentração crescente de GG traduziu-se no aumento do módulo de armazenamento e numa menor dependência face à frequência de oscilação. Contudo, concentrações de GG superiores a 0.5 % provocaram um decréscimo da rigidez do gel de β -conglícinina.

De forma similar, a adição de goma arábica às proteínas de soja aumentou a viscosidade do sistema e o coeficiente de consistência, o qual aumentou com o progressivo incremento das concentrações de biopolímeros (Salazar-Montoya *et al.*, 2012). Misturas contendo baixas concentrações de goma arábica apresentaram $G' > G''$ (módulo de perda) comportando-se predominantemente como sistemas elásticos enquanto que para concentrações elevadas de polissacarídeo (35 e 45 %) G' foi inferior a G'' exibindo, por isso, um comportamento predominantemente viscoso. Estes resultados mostraram um efeito antagonista à medida que a concentração de goma arábica e das proteínas de soja aumentou.

A limitada compatibilidade termodinâmica entre proteínas e polissacarídeos é uma das propriedades mais características dos sistemas mistos (Tolstoguzov *et al.*, 1986).

A valores de pH superiores ao *pI* das proteínas de soja, as interações entre polissacarídeos neutros como GG e GA e as proteínas dependerão de uma distribuição desigual dos resíduos polares providenciando assim regiões das macromoléculas capazes de estabelecerem interações eletrostáticas fracas bem como ligações de hidrogénio intermoleculares (Ahmed e Dickinson, 1991). Nos sistemas contendo proteínas de soja, GX ou GG ou suas misturas, as interações eletrostáticas fracas e as ligações de hidrogénio que se podem estabelecer resultam na formação de uma rede tridimensional que permite que os complexos solúveis aprisionem e retenham uma grande quantidade de água (Ahmed e Dickinson, 1991), que aumenta a fricção interna entre os complexos inchados aumentando a viscosidade e a tensão de inércia. Por outro lado, a natureza química das interações proteínas de soja/GA podem ser bastante mais complicadas. O antagonismo observado para baixas concentrações de GA (Ahmed e Dickinson, 1991) pode ser explicado com base na redução da carga negativa da proteína devido à formação de complexos eletrostáticos fracos, o que diminui a solubilidade e a capacidade de retenção de água, contribuindo deste modo para a redução das propriedades viscosas do sistema. Para concentrações de GA elevadas, o aumento das ligações de hidrogénio entre as macromoléculas sobrepõem-se ao efeito anteriormente descrito providenciando uma rede capaz de reter grandes quantidades de água aumentando a viscosidade do sistema para valores superiores aos registados com os componentes individuais.

A incompatibilidade termodinâmica entre proteínas e GA traduzida numa separação de fases, embora possa não ser visível através de resultados reológicos obtidos por ensaios dinâmicos a baixa deformação (Monteiro *et al.*, 2005) é rápida e facilmente detetada através da análise da microestrutura dos sistemas por microscopia confocal de varrimento de laser (descrita na secção 1.5.3.2).

Regra geral, misturas de proteínas de soja e polissacarídeos resultam numa separação de fases (Li *et al.*, 2008a; Li *et al.*, 2008b; Li *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2009; Cavallieri *et al.*, 2012), mais extensa quanto maior a concentração de polissacarídeo (Li *et al.*, 2008a) e na concentração local de cada componente (Li *et al.*, 2008a; Li *et al.*, 2008b; Li *et al.*, 2009; Cavallieri *et al.*, 2012), a qual depende do tamanho dos polímeros (Li *et al.*, 2008a; Li *et al.*, 2008b).

O processo de separação de fases pode resultar de fenómenos de depleção-floculação das cadeias do polissacarídeo (por exemplo, k-car, dextrano) (Li *et al.*, 2008a; Li *et al.*, 2009) o que resulta na interação efetiva entre os agregados de proteínas de soja e no aumento da incompatibilidade entre os biopolímeros obtendo-se assim uma microestrutura mais descontínua e heterogénea.

O estudo do efeito de polissacarídeos neutros nas propriedades gelificantes dos IPS mostra-se ainda pouco explorado, principalmente no que se refere à influência de particularidades estruturais destes polissacarídeos. Com este trabalho, pretendeu-se contribuir para o colmatar desta falha de conhecimento contribuindo para um melhor domínio dos sistemas mistos IPS-GM de modo a explorar possíveis novas formulações alimentares.

1.5 Métodos para caracterização de sistemas proteicos e sistemas mistos proteínas-polissacarídeos

Nesta secção é apresentada uma breve referência aos métodos aplicados neste trabalho para a caracterização dos sistemas proteicos e dos sistemas mistos IPS-GM.

1.5.1 Métodos reológicos

A Reologia é o ramo da ciência dirigido ao estudo da relação entre as forças externas que atuam sobre um corpo e a deformação ou escoamento que estas produzem.

A determinação das propriedades reológicas dos alimentos é importante no controlo de qualidade, no desenvolvimento de novos produtos e na previsão e seleção da textura dos produtos alimentares.

A teoria clássica da reologia divide os materiais em líquidos ou sólidos sendo o conceito de elasticidade aplicado a sólidos e a viscosidade aplicada a líquidos.

Num líquido perfeitamente viscoso (o fluido de Newton), a tensão depende apenas da taxa de deformação. O trabalho mecânico necessário para produzir qualquer deformação é dissipado instantaneamente. Por outro lado, num sólido perfeitamente elástico (o sólido de Hooke), a tensão depende da magnitude da deformação aplicada. O trabalho mecânico empregue na deformação é armazenado na forma de energia (Graessley, 1984).

Contudo, os alimentos são materiais complexos e podem ser considerados corpos viscoelásticos, ou seja, possuem caráter de sólido ou líquido, mais ou menos acentuado dependendo da tensão aplicada e da escala de tempo do processo de deformação.

A análise de um material viscoelástico é relativamente simples quando o mesmo apresenta comportamento linear. Nessas condições, a razão entre a tensão e a deformação, em qualquer instante ou frequência, é independente da magnitude da tensão ou deformação aplicada, sendo apenas função do tempo (Ferry, 1980). No intervalo linear, trabalha-se com deformações muito pequenas e a estrutura molecular praticamente não é afetada e, neste caso, pode dizer-se que os efeitos elásticos seguem a lei de Hooke e que os efeitos viscosos obedecem à lei de Newton (Barnes *et al.*, 1989).

Na caracterização da viscoelasticidade linear existem vários tipos de ensaios que determinam as relações entre tensão, deformação e tempo. Os mais importantes são os testes de fluência e recuperação, relaxação de tensões e ensaios oscilatórios dinâmicos. Estes últimos são particularmente úteis quando se pretende informação acerca da conformação macromolecular e das interações intermoleculares que ocorrem entre os componentes do sistema.

Num ensaio dinâmico, aplica-se ao material uma tensão ou deformação que varia sinusoidalmente com o tempo, a uma determinada frequência angular (ω) sendo medidas a amplitude e a diferença de fase entre a tensão e a deformação oscilatória. Nos ensaios em que a deformação (γ) é controlada, esta varia com o tempo, de acordo com a relação 1.1:

$$\gamma = \gamma_0 \sin \omega t \quad (1.1)$$

onde γ_0 é a amplitude máxima de deformação.

A tensão (σ) resultante correspondente à deformação aplicada pode ser expressa da seguinte forma:

$$\sigma = \sigma_0 \sin (\omega t + \delta) \quad (1.2)$$

onde σ_0 é a amplitude máxima de tensão.

A tensão pode ser representada como a soma dos componentes que estão em fase com a deformação e 90° fora de fase com a deformação:

$$\sigma = \gamma_0 [(G'(\omega)\sin\omega t + G''(\omega)\cos\omega t)] \quad (1.3)$$

onde $G'(\omega)$ e $G''(\omega)$ são os módulos de armazenamento e de perda de energia, respetivamente.

No caso de um sólido perfeitamente elástico, toda a energia é armazenada, isto é, G'' é zero e a tensão e a deformação estão em fase. Já para um líquido perfeitamente viscoso, toda a energia é dissipada em forma de calor, isto é, G' é igual a zero e a tensão e deformação estão 90° fora de fase. Assim, G' é uma propriedade associada a eventos moleculares de natureza elástica enquanto G'' está associado a eventos moleculares de origem viscosa.

As equações (1.1) e (1.3) podem ser combinadas para se obterem os parâmetros viscoelásticos G' e G'' :

$$G'(\omega) = \left[\frac{\sigma_0}{\gamma_0} \right] \cdot \cos\delta \quad (1.4)$$

$$G''(\omega) = \left[\frac{\sigma_0}{\gamma_0} \right] \cdot \sin\delta \quad (1.5)$$

$$\tan(\delta) = \frac{G''(\omega)}{G'(\omega)} \quad (1.6)$$

O módulo complexo $G^*(\omega)$ expressa a magnitude da resposta global do fluido, onde $G'(\omega)$ é o componente real e $G''(\omega)$ é o componente imaginário. A expressão do módulo complexo é dada pela equação (1.7):

$$G^*(\omega) = G'(\omega) + iG''(\omega) \quad (1.7)$$

A magnitude de $G^*(\omega)$ corresponde à razão entre a amplitude de máxima tensão (σ_0) e a amplitude de máxima deformação aplicada (γ_0), representada pela equação (1.8):

$$G^*(\omega) = \begin{pmatrix} \sigma_0 \\ \gamma_0 \end{pmatrix} \quad (1.8)$$

O processo de gelificação altera substancialmente as propriedades reológicas dos sistemas. A transição sol-gel torna-se aparente não só devido ao aumento da viscosidade (que pode ser medida através de ensaios de escoamento) mas também devido ao aumento nos valores de G' e G'' dos sistemas quando sujeitos a testes oscilatórios. Assim, neste trabalho, de forma a ser possível analisar e caracterizar o processo de gelificação e as respectivas propriedades viscoelásticas dos géis de proteína e proteína-polissacarídeo foram realizados fundamentalmente três tipos de ensaios dinâmicos: Varrimentos em temperatura, varrimentos em frequência (espectros mecânicos) e varrimentos em tempo, sobre os quais é apresentada de seguida uma breve explicação.

Os ensaios de varrimento em temperatura são utilizados para analisar alterações estruturais resultantes da variação da temperatura, sendo particularmente úteis para estudar as variações estruturais ocorridas em consequência do aumento da temperatura, durante a formação do gel. Neste tipo de ensaios os valores dos módulos viscoelásticos, G' e G'' , são determinados em função da temperatura, a uma frequência de oscilação constante. A variação da temperatura pode ocorrer em “escada”, por incrementos de temperatura bem definidos ou em “rampa” por definição de uma taxa de variação de temperatura.

Os ensaios de varrimento em frequência são, provavelmente, os ensaios oscilatórios mais comuns. Relacionam-se com o estudo da variação do comportamento viscoelástico de um material em função da taxa de aplicação da tensão. Assim, os valores de G' e G'' são obtidos em função da frequência de oscilação aplicada, a determinada deformação e a temperatura constante. Com base na relação entre G' e G'' , atribui-se normalmente a designação de “géis verdadeiros” a sistemas para os quais G' é superior (pelo menos 10 vezes) a G'' em toda a gama de frequências estudada, e praticamente independente da frequência; enquanto “géis fracos” atribui-se a sistemas para os quais G' e G'' apresentam uma diferença entre si menor e possuem maior dependência face à frequência.

Os ensaios de varrimento em tempo, muitas vezes designados por ensaios de maturação, são apropriados para estudar alterações estruturais do gel em função do tempo. Neste tipo

de ensaios, determina-se G' e G'' em função do tempo, para valores de frequência e temperatura constantes.

A medição das propriedades viscoelásticas dinâmicas utilizando a técnica de oscilação não destrutiva, ideal para monitorizar o processo de gelificação, permite um estudo indireto do efeito dos fatores físico-químicos, como sejam a concentração, o pH ou a temperatura, no mecanismo de formação do gel. O estudo dos efeitos destes fatores nas propriedades viscoelásticas pode ser usado para deduzir os seus efeitos físico-químicos ao nível molecular e assim entender melhor o mecanismo de gelificação (Tang *et al.*, 1993).

Antes da formação da rede polimérica transiente, para uma solução de um polímero na zona terminal em regime viscoelástico linear, G' e G'' exibem a seguinte dependência com a frequência:

$$G' \propto \omega^2 \quad (1.9)$$

$$G'' \propto \omega \quad (1.10)$$

Por sua vez, para uma estrutura tipo gel, G' e G'' tornam-se praticamente independentes da frequência, sendo G' superior a G'' . O comportamento geralmente observado para géis com elevada perfeição da rede macromolecular tridimensional traduz-se por um valor de G' uma ou duas ordens de grandeza superior a G'' e ambos os módulos essencialmente independentes da frequência angular, na gama experimental analisada.

Do ponto de vista experimental, encontram-se vários critérios reológicos para deteção do ponto de gelificação. Um destes critérios baseia-se no momento para o qual $G'=G''$, a determinada frequência de oscilação, ou seja, no momento a partir do qual o carácter elástico predomina relativamente ao carácter viscoso do sistema (Ross-Murphy, 1991). Contudo, para polímeros sintéticos e biopolímeros, o tempo para o qual G' cruza G'' é dependente da frequência de oscilação. Uma vez que o tempo de gelificação é uma propriedade intrínseca do material, o critério de determinação do tempo de gelificação não pode, portanto, ser dependente das condições experimentais aplicadas. Assim, o tempo para o qual $G' \cong G''$ não pode ser considerado um critério geral para a definição do ponto crítico correspondente à transição sol-gel, embora, o tempo para o qual $G' \cong G''$ deva ser

próximo do tempo real da transição sol-gel. Winter e Chambon (1986) definiram a transição sol-gel como sendo o ponto para o qual G'/G'' é independente da frequência. Um outro critério frequentemente utilizado baseia-se na identificação do momento/temperatura para o qual G' apresenta um aumento súbito do seu valor (Wang e Li, 2005), tornando-se superior ao valor de ruído do sinal do aparelho.

1.5.2 Análise Térmica

A calorimetria diferencial de varrimento (DSC) é uma técnica de análise térmica que regista o fluxo de energia calorífica associado a transições nos materiais em função da temperatura. É um método de variação entálpica, no qual a diferença no fornecimento de energia calorífica entre uma substância e um material de referência é medida em função da temperatura, enquanto ambas são submetidas a um mesmo programa de aquecimento ou arrefecimento, rigorosamente controlado. Esta técnica térmica é aplicável a vários materiais incluindo polímeros, produtos farmacêuticos e alimentos. Os ensaios realizados num calorímetro diferencial de varrimento fornecem informações qualitativas e quantitativas em função do tempo e temperatura, considerando as transições em materiais que envolvem processos endotérmicos e exotérmicos ou ainda mudanças na capacidade calorífica.

Na análise térmica por DSC, efetua-se um varrimento de temperatura na cápsula de referência e na cápsula contendo amostra e, simultaneamente, o calor adicionado à amostra, em relação à referência, é medido. Qualquer alteração induzida termicamente que ocorra na amostra é registada na forma de um pico no termograma.

A calorimetria diferencial de varrimento foi utilizada para estudar o processo de desnaturação de proteínas de soja, nomeadamente para avaliar o efeito de fatores externos nas temperaturas de desnaturação, como por exemplo, força iónica (Wagner *et al.*, 1992; Chronakis, 1996; Braga *et al.*, 2006); temperatura (Sorgentini *et al.*, 1995; Chronakis, 1996), concentração proteica (Wagner *et al.*, 1992), pH (Chronakis, 1996) e/ou o efeito de diferentes processamentos, nomeadamente, pressão hidrostática, hidrólise enzimática e métodos de extração distintos (Wagner *et al.*, 1992; Hua *et al.*, 2005). O efeito de

polissacarídeos na desnaturação das proteínas de soja foi também avaliado por DSC (Baeza *et al.*, 2002; Ortiz *et al.*, 2004; Braga *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2009).

1.5.3 Microscopia de géis

Uma das grandes preocupações da indústria alimentar é conceber produtos com as propriedades sensoriais desejadas pelo consumidor. Alguns dos processamentos aplicados têm em vista a obtenção de determinada microestrutura de forma a garantir as propriedades desejadas no produto final.

A microscopia fornece muitas das informações necessárias para descrever como se organiza a estrutura de determinado material e, conseqüentemente, como esta se relaciona com as propriedades do produto. A combinação de métodos microscópicos com outras técnicas pode promover o conhecimento do papel estrutural dos componentes individuais e o seu efeito na microestrutura dos produtos alimentares (Hermansson *et al.*, 2000).

A microscopia envolve técnicas que abrangem uma vasta gama de dimensões, entre 10^{-9} e 10^{-3} m e envolvem diferentes métodos de preparação que permitem obter informação específica como as interações entre biopolímeros e estruturas interfaciais e internas (Hermansson *et al.*, 2000).

Para a visualização e caracterização da microestrutura dos géis de proteínas de soja, vários trabalhos descritos na literatura recorreram à microscopia, nomeadamente, microscopia eletrónica de varrimento e microscopia confocal de varrimento laser.

Tendo sido os dois tipos de microscopia utilizados neste trabalho, segue uma breve referência a estas técnicas.

1.5.3.1 Microscopia eletrónica de varrimento

A microscopia eletrónica de varrimento (SEM) é muito utilizada na visualização de vários tipos de amostra, nomeadamente para análise da microestrutura dos géis proteicos. Nesta técnica microscópica detetam-se os eletrões que são emitidos ou refletidos da superfície de uma amostra. Como os eletrões são absorvidos pelo ar, a SEM decorre em vácuo e as amostras não devem libertar substâncias voláteis. Os processos de preparação das amostras

são bastante morosos e devem ser extremamente cuidados de forma a não destruir a microestrutura dos géis a observar.

1.5.3.2 Microscopia confocal de varrimento de laser

A microscopia confocal de varrimento laser (CLSM) é uma poderosa ferramenta para visualizar a estrutura de misturas de biopolímeros (van de Velde *et al.*, 2003).

O microscópio confocal combina o microscópio ótico de fluorescência com a análise eletrónica da imagem proporcionando imagens a três dimensões.

Esta técnica microscópica, ao contrário da microscopia eletrónica, não requer uma preparação extensiva da amostra, sendo apenas necessário adicionar um corante fluorescente que se ligue à fração que se pretende visualizar.

Vários trabalhos publicados têm mostrado a potencialidade e aplicabilidade desta técnica microscópica para o estudo de sistemas mistos, nomeadamente proteínas globulares (Schorsch *et al.*, 1999; Norton e Frith, 2001), incluindo as proteínas de soja (Turgeon *et al.*, 2003; Braga *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008b; Li *et al.*, 2009).

A microscopia confocal de varrimento laser tornou-se uma técnica complementar para o estudo reológico de sistemas, uma vez que permite analisar e comprovar situações que, muitas vezes, à escala reológica não são detetáveis, como por exemplo, a separação de fases.

1.5.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

A região do infravermelho no espectro eletromagnético corresponde à energia de muitas vibrações moleculares, em que a faixa de maior interesse está entre 4000 e 1400 cm^{-1} . Assim, esta técnica espectroscópica fornece informação sobre a energia de transições vibracionais envolvidas numa molécula.

A espectroscopia de infravermelho aplicada aos estudos estruturais de biomoléculas tornou-se muito vantajosa com o aparecimento de espectrómetros de infravermelho com software acoplado de modo que os espectros sejam tratados por transformada de Fourier (FT-IR) permitindo um enorme ganho de tempo, aumento de resolução, de sensibilidade e facilidade de tratamento dos dados. Métodos de aumento de resolução como a derivada e a

desconvulsão permitem visualizar os componentes de estrutura secundária contidas na banda do espectro de proteínas, nomeadamente de soja (Byler e Susi, 1986; Lefèvre e Subirade, 2001; Alvarez *et al.*, 2008; Tang e Ma, 2009; Wang *et al.*, 2011).

O espectro de infravermelho de proteínas possui diversas bandas relacionadas com a ligação peptídica e daí designarem-se por bandas amida. As bandas consideradas no estudo de proteínas são as bandas amida I, II e III que ocorrem aproximadamente em 1650, 1550 e 1300 cm^{-1} , respetivamente, sendo que a maioria dos estudos analisa apenas a banda amida I. Esta banda é formada fundamentalmente por vibrações do tipo estiramento axial (no eixo da ligação química) da ligação C=O acopladas com vibrações de estiramento da ligação C-N e de deformação angular CCN. As frequências das vibrações são dependentes de ligações de hidrogénio que os grupos C=O e N-H estabelecem. Os padrões destas, por sua vez, dependem da estrutura secundária presente na proteína justificando assim a sua importância para determinar estruturas secundárias de proteínas, bem como mudanças conformacionais decorrentes de alterações no ambiente em que a proteína está inserida. Na Tabela 1.2 apresentam-se as frequências vibracionais de absorção da amida I dos grupos peptídicos em diferentes conformações secundárias.

Tabela 1.2 – Números de onda da banda amida I dos grupos peptídicos em diferentes estruturas secundárias (Iconomidou *et al.*, 2000)

estrutura secundária	amida I (cm^{-1})
α -hélice	1650-1660
folhas β	1630
voltas β	1660-1690
desordenadas	1640-1650

Com base na literatura (Wang *et al.*, 2011), a Tabela 1.3 resume as atribuições de bandas correspondentes à região amida I de espetros de FT-IR de proteínas de soja.

Tabela 1.3- Números de onda e correspondente atribuição de banda correspondentes à região amida I dos espectros de FT-IR de proteínas de soja

nº de onda (cm⁻¹)	atribuição da banda
1611	vibração de cadeias laterais
1618	folhas β antiparalelas
1618	cadeias agregadas
1628-1630	cadeias β
1635-1636	folhas β
1644	estruturas desordenadas
1652	α -hélices
1661-1664	voltas β (β -turns)
1674	cadeias β (β -strand)
1682	folhas β antiparalelas
1682	cadeias agregadas
1691	estruturas tipo β

Referências Bibliográficas

- Ahmed, M. e Dickinson, E. (1991). Foaming of aqueous solutions of protein + propylene glycol alginate. *Food Hydrocolloids*, 4: 395-402.
- Allain, A-F., Paquin, P. e Subirade, M. (1999). Relationships between conformation of β -lactoglobulin in solution and gel states as revealed by attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 29: 337-344.
- Alting, A.C., Hamer, R.J., De Kruif, C.G., Paques, M. e Visschers, R.W. (2003). Number of thiol groups rather than the size of the aggregates determines the hardness of cold set whey protein gels. *Food Hydrocolloids*, 17: 469-479.
- Alting, AC. (2003). *Cold gelation of globular proteins*. Tese de Doutorado, Wageningen University.
- Alvarez, P.A., Ramaswamy, H.S. e Ismail, A.A. (2008). High pressure gelation of soy proteins: Effect of concentration, pH and additives. *Journal of Food Engineering*, 88: 331-340.
- Añón, M.C., Sargentini, D.A. e Wagner, J.R. (2001). Relationship between different hydration properties of commercial and laboratory soybean isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 4852-4858.
- Arrese, E.L., Sargentini, D.A., Wagner, J.R. e Añón, M.C. (1991). Electrophoretic, solubility and functional properties of commercial soy protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39: 1029-1032.
- Badley, R.A., Atkinson, D., Hauser, H., Oldani, D., Green, J. P. e Stubbs, J.M. (1975). The structure, physical and chemical properties of the soybean protein glycinin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 412: 214-228.
- Baeza, R.I., Carp, D.J., Pérez, O.E. e Pilosof, A.M.R. (2002). K-Carrageenan-protein interactions: effect of proteins on polysaccharide gelling and textural properties. *LWT-Food Science and Technology*, 35: 741-747.
- Barnes, H.A., Hutton, J.F. e Walters, K. (1989). *An Introduction to Rheology* (p.199). Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Braga, AL.M., Azevedo, A, Marques, M.J., Menossi, M. e Cunha, R.L. (2006). Interactions between soy protein isolate and xanthan in heat-induced gels: the effect of salt addition. *Food Hydrocolloids*, 20: 1178-1189.
- Britten, M. e Giroux, H.J. (2001). Acid-induced gelation of whey protein polymers: effect of pH and calcium concentration during polymerization. *Food Hydrocolloids*, 15: 609-617.
- Bryant, C.M. e McClements, D.J. (1998). Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heated-denatured whey. *Trends in Food Science and Technology*, 9: 143-151.
- Bryant, C.M. e McClements, D.J. (2000). Influence of sucrose on NaCl-induced gelation of heat denatured whey protein solutions. *Food Research International*, 33: 649-653.

- Byler, D.M. e Susi, H. (1986). Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers*, 25: 469-487.
- Cavallieri, AL.F., Garcez, M.M., Takeuchi, K.P. e Lopes da Cunha, R.L. (2010). Heat-induced gels of soy protein and k-carrageenan at different pH values. *International Journal of Food Science & Technology*, 45: 1130-1137.
- Chronakis, I.S. (1996). Network formation and viscoelastic properties of commercial soy protein dispersions; effect of heat treatment, pH and calcium ions. *Food Research International*, 29: 123-134.
- Clark, AH. e Lee-Tuffnell, C.D. (1986). Gelation of globular proteins. Em Mitchell, J.R., Ledward, D.A. (Eds.) *Functional Properties of Food Macromolecules* (p.203-272). Elsevier Applied science, London.
- Damodaran, S. (1988). Refolding of thermally unfolded soy proteins during the cooling regime of the gelation process: effect on gelation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36: 262-269.
- Damodaran, S. (1989). Interrelationship of molecular and functional properties of food proteins. Em Kinsella, E.J. (Ed.) *Food Proteins* (p.21-51). The American Oil Chemists' Society, USA.
- Damodaran, S. (1997). Food proteins: An overview. Em Damodaran, S.(Eds.). *Food Proteins and Their Applications* (p. 1-24). Marcel Dekker, Inc, New York.
- Damodaran, S. e Kinsella, J. (1982). Effect of conglitin on the thermal aggregation of glicinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30: 812-817.
- Danilenko, A.N., Bikbov, T.M., Grinberg, V.Y., Leontéva, A.L., Burova, T.V., Surikov, V.V., Borisov, Y.A. e Tolstoguzov, V.B. (1987). Effect of pH on the thermal stability of 11S-globulin of *Glycine Max* seeds as indicated by differential scanning microcalorimetry. *Biophysics*, 32: 434-439.
- Dickinson, E. e Stainsby, G. (1988). Emulsion stability. Em Dickinson, E. E Stainsby, G. (Eds.) *Advances in Food Emulsions and Foams* (p.1-44), Elsevier Applied Science, London.
- Doublier, J.-L., Garnier, C., Renard, D. e Sanchez, C. (2000). Protein-polysaccharide interactions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 5: 202-214.
- Durand, D.D., Gimel, J.C. e Nicolai, T. (2002). Agregation, gelation and phase separation of heat denatured globular proteins. *Physica A*, 304: 253-265.
- Eleya, M.M.A e Turgeon, S.L. (2000). The effects of pH on the rheology of β -lactoglobulin/k-carrageenan mixed gels. *Food Hydrocolloids*, 14: 245-251.
- Ferry, J.D. (1980). *Viscoelastic Properties of Polymers* (p.641). John Wiley & Sons, New York.
- Foegeding, E.A., Bowland, E.L. e Hardin, C. (1995). Factors that determine the fracture properties and microstructure of globular protein gels. *Food Hydrocolloids*, 9: 237-249.
- Foegeding, E.A., Dayton, W.R. e Allen, C.E. (1986). Interactions of myosin-albumin and myosin-fibrinogen to form protein gels. *Journal of Food Science*, 51: 109-112.
- Golbitz, P. (1995). Traditional soyfoods: processing and products. *Journal of Nutrition*, 125:

570-572.

Gosal, W.S. e Ross-Murphy, S.B. (2000). Globular protein gelation. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 5: 188-194.

Graessley, W.W. (1984). Viscoelastic and flow in polymers melts and concentrated solutions. Em Mark, J.E., Einseberg, A., Graessley, W.W., Madelkern, L., Koenig, J.L. *Physical Properties of Polymers* (p.97-153). American Chemical Society, Washington.

Gringberg, V.Y.A. e Tolstoguzov, V.B. (1997). Thermodynamic incompatibility of protein and polysaccharide in solution. *Food Hydrocolloids*, 11: 145-158.

Hemar, Y., Tamehana, M., Munro, P.A. e Singh, H. (2001). Viscosity, microstructure and phase behavior of aqueous mixtures of commercial milk protein products and xanthan gum. *Food Hydrocolloids*, 15:565-574.

Hermansson, A.M. (1978). Physico-chemical aspects of soy proteins structure formation. *Journal of Texture Studies*, 9: 33-58.

Hermansson, A.M. (1985). Structure of soya glycinin and conglycinin gels. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36: 822-832.

Hermansson, A.M. (1986). Soy protein gelation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 63: 658-666.

Hermansson, A.M. (1994). Microstructure of protein gels related to functionality. Em *Protein structure-function relationships in foods* (p. 22-42). Blackie Academic, Professional, London.

Hermansson, A-M., Langton, M. e Lorén, N. (2000). New approaches to characterizing food microstructures. *MRS Bulletin*, December, 30-36.

Hongsprabhas, P. e Barbut, S. (1997a). Effects of N-ethylmeimide and CaCl₂ on cold gelation of whey protein isolate. *Food Research International*, 30: 451-455.

Hongsprabhas, P. e Barbut, S. (1997b). Effects of gelation temperature on Ca²⁺ induced gelation of whey protein isolate. *LWT-Food Science and Technology*, 30: 45-49.

Horner, D.S. (1999). Formation and structure of acidified milk gels. *International Dairy Journal*, 9: 261-268.

Hsua, S. (1999). Rheological studies on gelling behavior of soy protein isolates. *Journal of Food Science*, 64: 136-140.

Hua, Y., Cui, S.W., Wang, Q., Mine, Y. e Poysa, V. (2005). Heat induced gelling properties of soy protein isolates prepared from different soybean flours. *Food Research International*, 38: 377-385.

Hua, Y., Cui, S.W. e Wang, Q. (2003). Gelling property of soy protein-gum mixtures. *Food Hydrocolloids*, 17: 889-894.

Iconomidou, V.A, Chryssikos, G.D., Gionis, V., Pavlidis, M.A., Paipetis, A. e Hamodrakas, S.J. (2000). Secondary structure of chorion proteins of the teleostean fish *Dentex dentex* by ATR FT-IR and FT-Raman spectroscopy. *Journal of Structural Biology*, 132:112-122.

- Ipsen, R. (1995). Mixed gels made from protein and k-carrageenan. *Carbohydrate Polymers*, 28: 337-339.
- Iwabuchi, S. e Shibasaki, K. (1981). Immunochemical studies of the effects of ionic strength on thermal denaturation of soybean 7S globulin. *Agriculture Biological Chemistry*, 45: 1365-1371.
- Iwabuchi, S. e Yamauchi, F. (1987). Electrophoretic analysis of whey proteins present in soybean globulin fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35: 205-209.
- Jeng-Yune, L., An-I, Y e Kang-Li, F. (2007). Gelation characteristics and morphology of corn rabe/soy protein concentrate composites during heating. *Journal of Food Engineering*, 78: 1240-1247.
- Kester, J.J. e Richardson, T. (1984). Modification of whey proteins to improve functionality. *Journal of Dairy Science*, 67: 2757-2774.
- Kinsella, J.E. (1979). Functional properties of soy proteins. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 56: 242-258.
- Kinsella, J.E., Rector, D.J. e Philips, L.G. (1994). Physico-chemical properties of proteins: texturization via gelation, glass and film formation. Em: Yada, R.Y.; Jackman, R.L.; Smith, J.L. (Eds.). *Protein Structure-Function Relationships in Foods* (p.1-21). Blackie Academic, Professional, Glasgow.
- Koshiyama, I. (1983). Storage proteins of soybean. Em Gottschalk, W; Muller, H.P.(Eds.) *Seed Proteins Biochemistry, Genetics, Nutritive Value* (p.427-450). Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, The Hague, The Netherlands.
- Kuipers, B.J.H., Koningsveld, G.A., Alting, A.C., Driehuis, F., Gruppen, H. e Voragen, A.G.J. (2005). Enzymatic hydrolysis as a means of expanding the cold gelation conditions of soy proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 1031-1038.
- Lakemond, C.M.M., de Jongh, H.H.J., Hessing, M., Gruppen, H. e Voragen, A.G.J. (2000). Soy glycinin: Influence of pH and ionic strength on solubility and molecular structure at ambient temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 1985-1990.
- Lakemond, C.M.M., de Jongh, H.H.J., Paques, M., Vliet, T., Gruppen, H. e Voragen, A.G.J. (2003). Gelation of soy glycinin: Influence of pH and ionic strength on network structure in relation to protein conformation. *Food Hydrocolloids*, 17: 365-377.
- Lefèvre, T. e Subirade, M. (2001). Molecular structure and interaction of biopolymers as viewed by fourier transform infrared spectroscopy: model studies on β -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*, 15: 365-376.
- Li, J-Y., Yeh, A-I. e Fan, K-L. (2007). Gelation characteristics and morphology of corn starch/soy protein concentrate composites during heating. *Journal of Food Engineering*, 78: 1240-1247.
- Li, X., Cheng, Y., Yi, C., Yang, C. e Cui, S. (2009). Effect of ionic strength on the heat-induced soy protein aggregation and the phase separation of soy protein aggregate/dextran mixtures. *Food Hydrocolloids*, 23: 1015-1023.

Li, X., Deng, F., Hua, Y., Qiu, A., Yang, C. e Cui, S. (2008a). Effect of molecular weight of dextran on the phase behavior and microstructure of preheated soy protein/dextran mixtures. *Carbohydrate Polymers*, 72: 160-168.

Li, X., Hua, Y., Qiu, A., Yang, C. e Cui, S. (2008b). Phase behavior and microstructure of preheated soy proteins and kappa-carrageenan mixtures. *Food Hydrocolloids*, 22: 845-853.

Liu, K. (1997). *Soybeans: Chemistry, Technology and utilization* (p.532). Chapman and Hall, New York.

Maltais, A., Remondetto, G.E. e Subirade, M. (2008). Mechanisms involved in the formation and structure of soya protein cold-set gels: a molecular and supramolecular investigation. *Food Hydrocolloids*, 22: 550-559.

Maltais, A., Remondetto, G.E., Gonzalez, R. e Subirade, M. (2005). Formation of soy protein isolate cold-set gels: protein and salt effects. *Journal of Food Science*, 70: 67-73.

Mangino, M.E. (1992). Gelation of whey protein concentrate. *Food Technology*, 46: 114-115.

Monteiro, S.R., Tavares, C., Evtuguin, D.V., Moreno, N. e Lopes da Silva, J.A (2005). Gelation of whey protein/polysaccharide mixtures at neutral pH: The effect of galactomannan with different molecular mass. *Biomacromolecules*, 6:3291-3299.

Mori, T., Nakamura, T. e Utsumi, S. (1986). Behavior of intermolecular bond formation in the stage of heat induced gelation of glycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34: 33-36.

Morris, V.J. (1998). Gelation of Polysaccharides. Em Hill, S.E., Ledward, D.A., Mitchell, J.R. (Eds.) *Functional Properties of Food Macromolecules* (p.143-227). Gaithersburg, Maryland.

Morris, V.J. e Wilde, P.J. (1997). Interactions of food biopolymers. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 2: 567-572.

Nakai, S.J. (1983). Structure-function relationships of food proteins with an emphasis on the importance of protein hydrophobicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31: 676-683.

Norton, I.T. e Frith, W.J. (2001). Microstructure design in mixed biopolymer composites. *Food Hydrocolloids*, 15: 543-553.

Ortiz, S.E., Molina, Puppo, M.C. e Wagner, J.R. (2004). Relationship between structural changes and functional properties of soy protein isolates-carrageenan systems. *Food Hydrocolloids*, 18: 1045-1053.

Petrucelli, S. e Añón, M.C. (1994). Relationship between the method of obtention and the structural and rheological properties of soy protein isolates. 1. Structural and hydration properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42: 2161-2169.

Petrucelli, S. e Añón, M.C. (1995). Thermal aggregation of soy protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 3035-3041.

Phillips, L.G., Whitehead, D.M. e Kinsella, J. (1994). *Structure-Function Properties of Food Proteins*. Food Science and Technology Series. Academic Press Limited, London.

- Puppo, M.C. e Añón, M.C. (1998). Structural properties of heat-induced soy protein gels as affected by ionic strength and pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 3583-3589.
- Puppo, M.C., Lupano, C.E. e Añón, M.C. (1995). Gelation of soybean protein isolates in acidic conditions. Effect of pH and protein concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 2356-2361.
- Puyol, P., Perez, M.D. e Horne, D.S. (2001). Heat-induced gelation of whey protein isolates (WPI): effect of NaCl and protein concentration. *Food Hydrocolloids*, 15: 233-237.
- Renard, D., Velde, F. e Visschers, R.W. (2006). The gap between food gel structure, texture and perception. *Food Hydrocolloids*, 20: 423-431.
- Renkema, J.M.S. (2004). Relations between rheological properties and network structure of soy protein gels. *Food Hydrocolloids*, 18: 39-47.
- Renkema, J.M.S. e van Van Vliet, T. (2002). Heat-induced gel formation by soy proteins at neutral pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 1569-1573.
- Renkema, J.M.S., Gruppen, H. e van Van Vliet, T. (2002). Influence of pH and ionic strength on heat-induced formation and rheological properties of soy protein gels and in relation to denaturation and their protein compositions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 6064-6071.
- Renkema, J.M.S., Knabben, J.H.M. e van Van Vliet, T. (2001). Gel formation by β -conglycinin and glycinin and their mixtures. *Food Hydrocolloids*, 15: 407-414.
- Ross-Murphy, S.B. (1991). The estimation of junction zone size from gel time measurements. *Carbohydrate Polymers*, 14: 281-294.
- Salazar-Montoya, J.A., Jiménez-Avalos, H.A. e Ramos-Ramírez, E.G. (2012). Effects of gum arabic concentration and soy proteins on the flow and viscoelasticity of their dispersions. *International Journal of Food Properties*, 15: 891-902.
- Sánchez, V.E., Bartholomai, G.B. e Pilosof, A.M.R. (1995). Rheological properties of gums as related to their water binding capacity and to soy protein interaction. *LWT-Food Science and Technology*, 28: 380-385.
- Sarkar, N. (1995). Kinetics of thermal gelation of methylcellulose and hydroxypropylmethylcellulose in aqueous solutions. *Carbohydrate Polymers*, 26: 195-203.
- Schmidt, R. H. (1981). Gelation and coagulation. Em Cherry, J. P. (Ed), *Protein Functionality in Foods* (p.131- 153). ACS Symposium Series 147, USA.
- Schorsch, C., Jones, M.G. e Norton, I.T. (1999). Thermodynamic incompatibility and microstructure of milk protein/locust bean gum/sucrose systems. *Food Hydrocolloids*, 13: 89-99.
- Scilingo, A.A. e Añón, M.C. (2004). Characterization of soybean protein isolates: the effect of calcium presence. *Journal of the American Chemical Society*, 81: 63-69.
- Sorgentini, D.A., Wagner, J.R. e Añón, M.C. (1995). Effects of thermal treatment of soy protein isolate on the characteristics and structure-function relationship of soluble and insoluble

fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 2471-2479.

Speroni, F., Jung, S. e de Lamballerie, M. (2010). Effects of calcium and pressure treatment on the thermal gelation of soybean protein. *Journal of Food Science*, 75: E30-E38.

Stephen, A.M. e Churms, S.C. (1995). *Food polysaccharides and their applications* (p.61). Marcel Dekker Inc., New York.

Sykes, G.E. e Gayler, K.R. (1981). Detection and characterization of a new β -conglycinin from soybean seeds. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 210: 525-530.

Syrbe, A., Bauer, W.J. e Klostermeyer, H. (1998). Polymer science concepts in dairy systems-An overview of milk protein and food hydrocolloid interaction. *International Dairy Journal*, 8: 179-193.

Tang, B.Q., McCarthy, O.J. e Munro, P.A. (1993). Oscillatory rheological study of the gelation mechanism of whey protein concentrate solutions: effects of physicochemical variables on gel formation. *Journal of Dairy Research*, 60: 543-555.

Tang, C-H. e Ma, C-Y. (2009). Effect of high pressure treatment on aggregation and structural properties of soy protein isolate. *LWT-Food Science and Technology*, 42: 606-611.

Thanh, V.H. e Shibasaki, K. (1978). Major proteins of soybean seeds. Subunit structure of β -conglycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26: 692-695.

Tolstoguzov, V.B. (1991). Functional properties of food proteins and role protein-polysaccharide interaction. *Food Hydrocolloids*, 4: 429-468.

Totosaus, A., Montejano, J.G., Salazar, J.A. e Guerrero, I. (2002). A review of physical and chemical protein-gel induction. *International Journal of Food Science and Technology*, 37: 589-601.

Turgeon, S.L., Beaulieu, M., Schmitt, C. e Sanchez, C. (2003). Protein-polysaccharide interactions: phase-ordering kinetics, thermodynamic and structural aspects. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 8: 401-414.

Utsumi, S. e Kinsella, J.E. (1985). Structure-function relationships in food proteins: subunit interactions in heat-induced gelation of 7S, 11S and soy protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33: 297-303.

Utsumi, S., Inaba, H. e Mori, T. (1981). Heterogeneity of soybean glycinin. *Phytochemistry*, 20: 585-589.

van de Velde, F., Weinbreck, F., Edelman, M.W., van der Linden, E. e Tromp, R.H. (2003). Visualisation of biopolymer mixtures using confocal scanning laser microscopy (CSLM) and covalent labelling techniques. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 31: 159-168.

Vojdani, F. (1996). *Methods of Testing Protein Functionality* (p.11-60). Hall, Chapman e Hall, London.

Wagner, J.R. e Guéguem, J. (1999). Surface functional properties of native, acid-treated, and

reduced soy glycinin. 1. Emulsifying properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 2181-2187.

Wagner, J.R., Sorgentini, D.A. e Añón, M.C. (1992). Effect of physical and chemical factors on rheological behavior of commercial soy protein isolates: protein concentration, water imbibing capacity, salt addition and thermal treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 1930-1937.

Wagner, J.R., Sorgentini, D.A. e Añón, M.C. (2000). Relation between solubility and surface hydrophobicity as an indicator of modifications during preparation processes of commercial and laboratory-prepared soy protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 3159-3165.

Wang, C-H. e Damodaran, S. (1991). Thermal gelation of globular proteins: Influence of protein conformation on gel strength. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39: 433-438.

Wang, Q. e Li, L. (2005). Effects of molecular weight on thermoreversible gelation and gel elasticity of methylcellulose in aqueous solution. *Carbohydrate Polymers*, 62: 232-238.

Wang, J-M., Yang, X-Q., Yin, S-W., Zhang, Y., Tang, C-H., Li, B-S., Yuan, D-B. e Guo, J. (2011). Structural rearrangement of ethanol-denatured soy proteins by high hydrostatic pressure treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 7324-7332.

Winter, H.H. e Chambon, F. (1986). Analysis of linear viscoelasticity of a crosslinking polymer at the gel point. *Journal of Rheology*, 30: 367-382.

Wolf, J.W. (1970). Soybean proteins: their functional, chemical and physical properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 18: 969-975.

Wolf, W.J., Rackis, J.J., Smith, A.K., Sasame, H.A. e Babcock, G.E. (1958). Behavior of the 11S protein of soybeans in acidic solutions. I. Effects of pH, ionic strength and time on ultracentrifugal and optical rotary properties. *Journal of the American Chemical Society*, 80: 5730-5735.

Wolf, J.W. e Nelsen, T.C. (1996). Partial purification and characterization of the 15S globulin of soybeans, a dimer of glycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 785-791.

Yamauchi, F., Sato, M., Sato, W., Kamata, K. e Shibasaki, K. (1981a). Isolation and identification of a new type of β -conglycinin in soybean globulins. *Agriculture and Biological Chemistry*, 45: 2863-2868.

Yamauchi, F., Yamagishi, T.Y. e Iwabushi, S. (1991). Molecular understanding of heat-induced phenomena of soybean protein. *Food Review International*, 7: 283-322.

Yamauchi, T., Yamauchi, F. e Shibasaki, K. (1981b). Electrophoretic and differential thermal analysis of soybean 11S globulin heated in the presence of N-ethylmaleimide. *Agriculture and Biological Chemistry*, 45: 1661-1668.

Yao, J.J., Wei, L.S. e Steinberg, M.P. (1988). Water imbibing capacity and rheological properties of isolated soy proteins. *Journal of Food Science*, 53: 464-467.

Zayas, J.F. (1997). Gelling properties of proteins. Em *Functionality of Proteins in Food*. (pp. 310-366). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

Zhu, J-H., Yang, X-Q., Ahmad, I., Wang, X-Y. e Wu, L-Y. (2009). Effect of guar gum on the

Capítulo 1

rheological, thermal and textural properties of soybean β -conglycinin gel. *International Journal of Food Science and Technology*, 44: 1314-1322.

CAPÍTULO 2

Obtenção e avaliação das propriedades físico-químicas e funcionais de isolados de proteína de soja obtidos a partir de diferentes matérias-primas

O trabalho apresentado neste capítulo resultou da estratégia utilizada para ultrapassar as primeiras dificuldades encontradas na execução deste projeto de investigação.

Para a realização prática do trabalho foram obtidas amostras de isolados comerciais de proteínas de soja, com diferentes origens e com características funcionais distintas. Durante os ensaios preliminares de gelificação, através de medições reológicas em regime oscilatório e varrimento em temperatura, estes isolados apresentaram um perfil de gelificação diferente do habitualmente descrito na literatura para proteínas de soja. Devido a este facto e ao desconhecimento sobre o tratamento industrial aplicado a estas amostras proteicas, decidiu-se preparar, laboratorialmente, isolados de proteína de soja a partir da farinha de soja, um desperdício e sub-produto da produção de óleo de soja. Durante o processo de extração industrial deste óleo são aplicadas diferentes temperaturas, pelo que se supôs que os isolados proteicos obtidos a partir destas matérias-primas intermediárias tivessem propriedades funcionais distintas.

Assim, neste capítulo descreve-se a extração e a caracterização físico-química e funcional de IPS obtidos laboratorialmente a partir dos produtos intermediários da extração industrial do óleo de soja. É ainda objetivo comparar as propriedades destes isolados com as de isolados comerciais.

2.1 Introdução

Nesta secção aborda-se a informação disponível acerca da influência de diversos fatores, com especial atenção aos processos de obtenção dos IPS, sobre a composição e propriedades funcionais destas proteínas.

As propriedades funcionais dos isolados de proteína de soja (IPS) refletem a composição, estrutura, grau de desnaturação e de agregação das suas proteínas mais abundantes, a glicinina (11S) e a β -conglucina (7S). Os diferentes tratamentos aplicados durante a extração e/ou processamento causam alterações físicas e químicas nas proteínas (Kinsella, 1979). O método de isolamento das proteínas afeta a percentagem da fração proteica do isolado e também a estrutura proteica (López de Ogara *et al.*, 1992). IPS produzidos comercialmente podem apresentar características bastante diferentes das proteínas de soja nativas devido às condições de processamento, as quais podem causar desnaturação e vários níveis de agregação proteica (Hermansson, 1986).

Vários trabalhos têm sido realizados com o objetivo de compreender o efeito das condições de extração e/ou processamento dos isolados nas propriedades funcionais das proteínas de soja (Sorgentini *et al.*, 1991; Wagner *et al.*, 1992; Wagner *et al.*, 1996; Puppo *et al.*, 2000; Wagner *et al.*, 2000; Hua *et al.*, 2005).

É aceite que a funcionalidade das proteínas de soja depende basicamente do grau de dissociação, desnaturação e agregação das globulinas 7S e 11S (Arrese *et al.*, 1991; Puppo *et al.*, 2000). Por outro lado, o efeito dos diferentes tratamentos depende das condições do meio em que são aplicados (temperatura, duração do tratamento, concentração proteica, pH, força iônica) (Yamauchi *et al.*, 1991; Sorgentini *et al.*, 1991).

Embora o tratamento térmico, durante a extração das proteínas de soja seja fundamental para a eliminação de fatores antinutricionais está provado que provoca alterações conformacionais nas proteínas e afeta consideravelmente as suas propriedades funcionais, nomeadamente, a solubilidade, capacidade de retenção de água, viscosidade e gelificação (Hermansson, 1986; Yamauchi *et al.*, 1991; Lusas e Rhee, 1995; Sorgentini *et al.*, 1995; García *et al.*, 1998; Britten e Giroux, 2001; Durand *et al.*, 2002).

A sensibilidade das globulinas 7S e 11S ao tratamento térmico depende da força iônica do meio, sendo a fração 11S mais termoestável do que a fração 7S. A dissociação da globulina 11S, quando o aquecimento é realizado em força iônica 0.1 mol/L, ocorre parcialmente a 90 °C e totalmente a 100 °C enquanto que a desnaturação total da fração 7S ocorre por volta dos 70 °C (García *et al.*, 1997).

O efeito conjunto do tratamento térmico e da concentração proteica na dissociação das globulinas está reportado na bibliografia. De acordo com Yamagishi *et al.* (1983), durante o tratamento térmico (80 °C, 30 min), o aumento da concentração das frações 7S e 11S, provoca a precipitação das globulinas de soja. De acordo com Utsumi *et al.* (1984), nas soluções proteicas de baixa concentração (0.5 %) preparadas em tampão Tris-HCl (pH 8.0), 2-mercaptoetanol (0.01 mol/L) não se observa, com o aquecimento, a formação de precipitado mas sim a formação de macro-complexos solúveis, formados principalmente pela subunidade β -7S e o polipéptido básico B-11S (β -B), unidos por interações eletrostáticas. Nestas condições, a maior parte das subunidades α e α' -7S encontra-se, em

solução, na forma de monómeros juntamente com os polipéptidos ácidos da glicinina. A afinidade da subunidade β pelas subunidades básicas é explicada pela sua eletronegatividade e pela configuração do local de interação (Utsumi *et al.*, 1984; Renkema *et al.*, 2002).

O tratamento térmico influencia a turbidez das dispersões das proteínas de soja, aumentando-a com o aumento da temperatura até 90 °C devido à formação de agregados solúveis presentes nos sobrenadantes (German *et al.*, 1982; Yamauchi *et al.*, 1991). Contudo, o aquecimento prolongado a 100 °C provoca o aumento de subunidades polimerizadas insolúveis presentes apenas nos precipitados (Yamagishi *et al.*, 1983).

A β -conglycinina, fração 7S, em baixa concentração (0.5 % m/v) e sem adição de sais dissocia-se durante o aquecimento. Entretanto, a adição de sais, mesmo em concentrações baixas, provoca a agregação das subunidades que provavelmente mantêm-se dispersas devido à repulsão eletrostática (Renkema *et al.*, 2002). Os produtos de dissociação da β -conglycinina formados durante o aquecimento (95 °C, 5 min) podem ser reconvertidos em β -conglycinina pela adição de sais. A reassociação das subunidades parece ocorrer via interações eletrostáticas e hidrofóbicas (Iwabuchi e Shibasaki, 1981).

As modificações que alteram o grau de desnaturação e agregação das proteínas refletem-se na solubilidade e na capacidade de retenção de água e, conseqüentemente, em todas as propriedades funcionais características destas proteínas. A fração insolúvel é a principal responsável pela capacidade de retenção de água dos isolados (Sorgentini *et al.*, 1991), a qual se relaciona diretamente com a viscosidade, ao passo que a capacidade gelificante e espumante dependem maioritariamente da composição da fração solúvel (Arrese *et al.*, 1991).

O grau de desnaturação dos isolados de proteína de soja tem sido avaliado, geralmente, através da medição da entalpia de desnaturação por DSC. Arrese *et al.* (1991) verificaram que não existe uma relação direta entre solubilidade e desnaturação, devido provavelmente à influência de outros fatores. À medida que o grau de desnaturação dos IPS aumenta verifica-se que a proporção da subunidade β da globulina 7S diminuiu e simultaneamente ocorre a diminuição da proporção do polipéptido B da globulina 11S. Com base nos resultados obtidos e sabendo que B-11S se associa preferencialmente à subunidade β -7S (Utsumi *et al.*, 1984) foi proposto que em isolados completamente desnaturados, estas

subunidades formam agregados β -B insolúveis em água, agregados estes que existirão em muito pouca quantidade em isolados ricos em proteínas nativas. A capacidade gelificante dos IPS comerciais estudados foi diretamente relacionada com o conteúdo, na fração solúvel, da subunidade β -7S e do polipéptido B-11S, pelo que isolados contendo uma maior proporção destas subunidades na fração solúvel apresentam maior capacidade gelificante e maior viscosidade.

Com base no efeito das diferentes condições sobre as duas principais globulinas constituintes dos IPS, Sorgentini *et al.* (1995) demonstraram que é possível preparar uma variada gama de frações solúveis e insolúveis a partir de IPS nativos e alterados termicamente sob diferentes condições de temperatura e concentração. Os resultados obtidos mostraram que a percentagem e conteúdo da fração solúvel/insolúvel dependem da temperatura e concentração do isolado. Tanto a 80 °C, como a 100 °C, a percentagem da fração insolúvel aumentou com a temperatura do tratamento e com o aumento da concentração do isolado devido ao maior número de interações proteína-proteína. O tratamento a 80 °C promoveu a total desnaturação da globulina 7S e parcial desnaturação da 11S permitindo obter, por aumento da concentração do isolado, frações solúveis progressivamente enriquecidas em proteína 11S nativa e frações insolúveis maioritariamente constituídas por proteínas desnaturadas. Nos tratamentos a 100 °C, a desnaturação da 11S foi total e por isso não se registaram diferenças significativas no grau de desnaturação entre as frações solúvel e insolúvel. Contudo, estas diferiram na sua composição: isolados tratados a concentrações mais elevadas originaram frações solúveis com menor conteúdo de polipéptido B-11S e de subunidades α , α' e β -7S, resultando assim no enriquecimento em polipéptido A-11S e proteínas do soro. Estas diferenças refletiram-se na hidrofobicidade superficial e na tendência para agregar por indução com Mg^{2+} . Estas alterações de composição e estrutura das frações solúveis e insolúveis influenciaram, obviamente, as propriedades funcionais dos isolados proteicos. A capacidade de retenção de água e a viscosidade das frações insolúveis aumentou com a progressiva desnaturação proteica resultante do aumento da temperatura. Sorgentini *et al.* (1995) relacionaram a capacidade gelificante com a composição da fração solúvel, corroborando o trabalho de Arrese *et al.* (1991). Por outro lado, a capacidade de formar e estabilizar espumas foi relacionada com o enriquecimento, da fração solúvel, em proteínas

de pequena massa molecular e elevada flexibilidade, como consequência do aumento da temperatura e/ou concentração do isolado.

Resultados obtidos por Hua *et al.* (2005) corroboraram o trabalho de Arrese *et al.* (1991) e, curiosamente, mostraram que embora os três isolados estudados (dois comerciais e um laboratorial) apresentassem composição proteica e grau de desnaturação semelhantes, a turbidez, a hidrofobicidade superficial e a capacidade gelificante diferiam. A diferença de turbidez foi relacionada com a presença de lípidos residuais, contudo, os autores não conseguiram explicar a diferença da hidrofobicidade superficial, sugerindo a necessidade de se realizarem mais estudos nesta área. Por outro lado, o isolado contendo maior agregação, correspondendo a uma maior turbidez para um grau de desnaturação semelhante, foi o que apresentou menor capacidade gelificante, o que foi relacionado com o menor conteúdo em β -7S e B-11S na fração solúvel, como sugerido por Arrese *et al.* (1991) e Sorgentini *et al.* (1995).

Wagner *et al.* (2000) avaliaram o efeito de diferentes condições e tratamentos experimentais (tais como pH de redissolução, concentração proteica da suspensão a liofilizar, tempo/temperatura de tratamento térmico, diálise, adição e concentração de CaCl_2 , tratamento ácido/básico e/ou adição de agentes redutores) na solubilidade e hidrofobicidade superficial. No caso de isolados obtidos laboratorialmente, a relação estreita obtida entre essas duas propriedades reforçou o papel das interações hidrofóbicas para os processos de agregação e insolubilização das proteínas de soja. A elevada solubilidade obtida, a baixas concentrações proteicas de isolados laboratoriais, não foi alcançada com os isolados comerciais, o que foi atribuído ao efeito dos tratamentos industriais bastante severos, como por exemplo, secagem a elevadas concentrações, presença de sais adicionados intencionalmente ou acidentalmente (através da água utilizada) ou adição de fosfolípidos.

Embora as características dos IPS sejam determinadas, grandemente, pelo processamento e condições aplicadas para a sua obtenção é importante não esquecer que a origem do grão de soja e a composição proteica originam propriedades físico-químicas e funcionais variáveis (Poysa e Woodrow, 2002; Poysa *et al.*, 2006; Bainy *et al.*, 2008; Nik, *et al.*, 2009; Bainy *et al.*, 2010).

Lakemond *et al.* (2002) tentaram relacionar os genótipos com a composição das subunidades e a sua influência no grau de desnaturação das proteínas de soja. Novas variantes de soja com diferentes composições têm sido desenvolvidas de forma a obterem-se variantes com baixos níveis de componentes antinutricionais, com sabor melhorado devido à redução dos níveis de lipoxigenase (Kumar *et al.*, 2006) e com diferentes termoestabilidades (Lakemond *et al.*, 2002). A influência da composição sobre as propriedades funcionais destas novas variantes foi também investigada (Bainy *et al.*, 2008; 2010).

Nos últimos anos, de forma a ultrapassar as limitações resultantes da diversidade de propriedades das proteínas processadas têm sido estudadas metodologias que permitam otimizar o processo de extração de IPS e melhorar as suas propriedades funcionais. A tecnologia de ultrassons tem sido investigada como potencial técnica para melhorar a eficiência de extração dos isolados (Karki *et al.*, 2009) e aumentar a solubilidade de IPS comerciais (Tang *et al.*, 2009).

Em virtude da grande aplicação industrial da soja, na década de 90, vários grupos de investigação dedicaram os seus trabalhos ao estudo das propriedades funcionais das proteínas de soja obtidas, comercial ou laboratorialmente, a partir de farinha de soja desengordurada e ao efeito de diferentes tratamentos (temperatura, pH, adição de agentes redutores) nessas propriedades. Todavia, são poucos os trabalhos reportados na bibliografia que documentem a extração de IPS a partir de matérias-primas que não a farinha de soja e avaliem a relação das propriedades dessas matérias-primas com as propriedades funcionais finais dos isolados. Com este trabalho pretendeu-se colmatar esta falha de conhecimento e variar os produtos para extração de IPS de forma a diversificar e melhorar as propriedades funcionais deste tipo de proteínas. Por outro lado, pretendeu-se caracterizar adequadamente diferentes IPS de forma a definir, convenientemente, as amostras a utilizar nos estudos subsequentes.

2.2 Materiais e Métodos

2.2.1 Matérias-primas

Para a realização desta parte do trabalho utilizaram-se dois tipos de isolados de proteína de soja: isolados comerciais e isolados obtidos laboratorialmente.

Os isolados comerciais foram fornecidos pela Bunge Alimentos (Brasil) e, de acordo com o fornecedor, apresentam propriedades diferentes, um com boa dispersibilidade (*SPI 90 EG- IPS 5*) e outro com menor dispersibilidade (*SPI 90 HI- IPS 6*).

A extração laboratorial dos IPS foi realizada a partir de quatro matérias-primas, cedidas gentilmente pela IBEROL (Portugal): Grão de soja intacto (sem qualquer processamento industrial), grão de soja laminado (submetido industrialmente a 60 °C), farinha de soja desengordurada (extração industrial, com *n*-hexano, a 80 °C) e farinha de soja desengordurada e seca (processada industrialmente a 100 °C).

2.2.2 Extração do isolado de proteínas de soja a partir de diferentes matérias-primas

Os IPS foram obtidos a partir do grão de soja intacto, grão de soja laminado, farinha de soja desengordurada e farinha de soja desengordurada e seca. Para as primeiras duas matérias-primas, antes da etapa de extração das proteínas, realizou-se uma etapa para eliminação da gordura.

2.2.2.1 Obtenção da farinha de soja desengordurada

O grão de soja intato foi limpo, descascado, moído num moinho *Yellow line A10* (Gravimeta) com refrigeração de forma a evitar o aquecimento do grão e peneirado (crivo 0.4 mm). O grão de soja laminado foi tratado seguindo o mesmo procedimento.

A remoção da gordura foi efetuada por extração sequencial com *n*-hexano (1:3 m/v), à temperatura ambiente, sob agitação controlada durante 1 h. De seguida, filtrou-se o resíduo e ressuspendeu-se, novamente, em *n*-hexano (1:3) e repetiu-se o procedimento anteriormente descrito por mais três vezes. A farinha desengordurada foi seca durante a noite em *hotte* com ventilação.

De forma a determinar o número de ciclos de extração realizaram-se ensaios preliminares de espectroscopia de infravermelho (FT-IR) dos resíduos da extração após secagem. As condições dos ensaios de FT-IR foram as descritas na secção 2.2.3.8. O número de ciclos foi definido com base no número de extrações sequenciais necessárias até à ausência do pico situado a 1735 cm^{-1} característico dos lípidos.

2.2.2.2 Extração do isolado de proteínas de soja a partir da farinha de soja desengordurada

Os isolados proteicos foram preparados laboratorialmente, a partir de farinha de soja desengordurada, industrial e laboratorialmente, com base no procedimento descrito por Wagner *et al.* (1996) e com algumas adaptações de Renkema e Vliet (2002) (Figura 2.1).

A farinha de soja foi suspensa em água na razão 1:10 (m/v) e o pH ajustado, periodicamente, para 8.0 ± 0.5 por adição de NaOH 2 mol/L. A dispersão foi mantida, sob agitação moderada, à temperatura ambiente, durante 2 h e depois centrifugada (12000 g, a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min).

Os extratos foram ajustados para $\text{pH } 4.8 \pm 0.1$ com HCl 2 mol/L de forma a induzir a precipitação das proteínas de soja. Após 2 h a $25,^{\circ}\text{C}$, a dispersão foi centrifugada (12000 g, $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 min). Os precipitados foram ressuspensos em água, com agitação à temperatura ambiente até dissolução após o pH ter sido ajustado para 7.0 com NaOH 1 mol/L. Seguidamente a solução foi congelada com azoto líquido e liofilizada. Os liofilizados foram triturados até se obter um pó fino. O procedimento foi repetido o número de vezes necessário para se obter a quantidade de IPS suficiente para a realização do trabalho experimental.

Os IPS obtidos foram designados por IPS 1, IPS 2, IPS 3 e IPS 4, correspondendo aos obtidos a partir do grão de soja intacto (moído em laboratório), grão de soja laminado (moído em laboratório), farinha de soja desengordurada e farinha de soja desengordurada e seca, respetivamente.

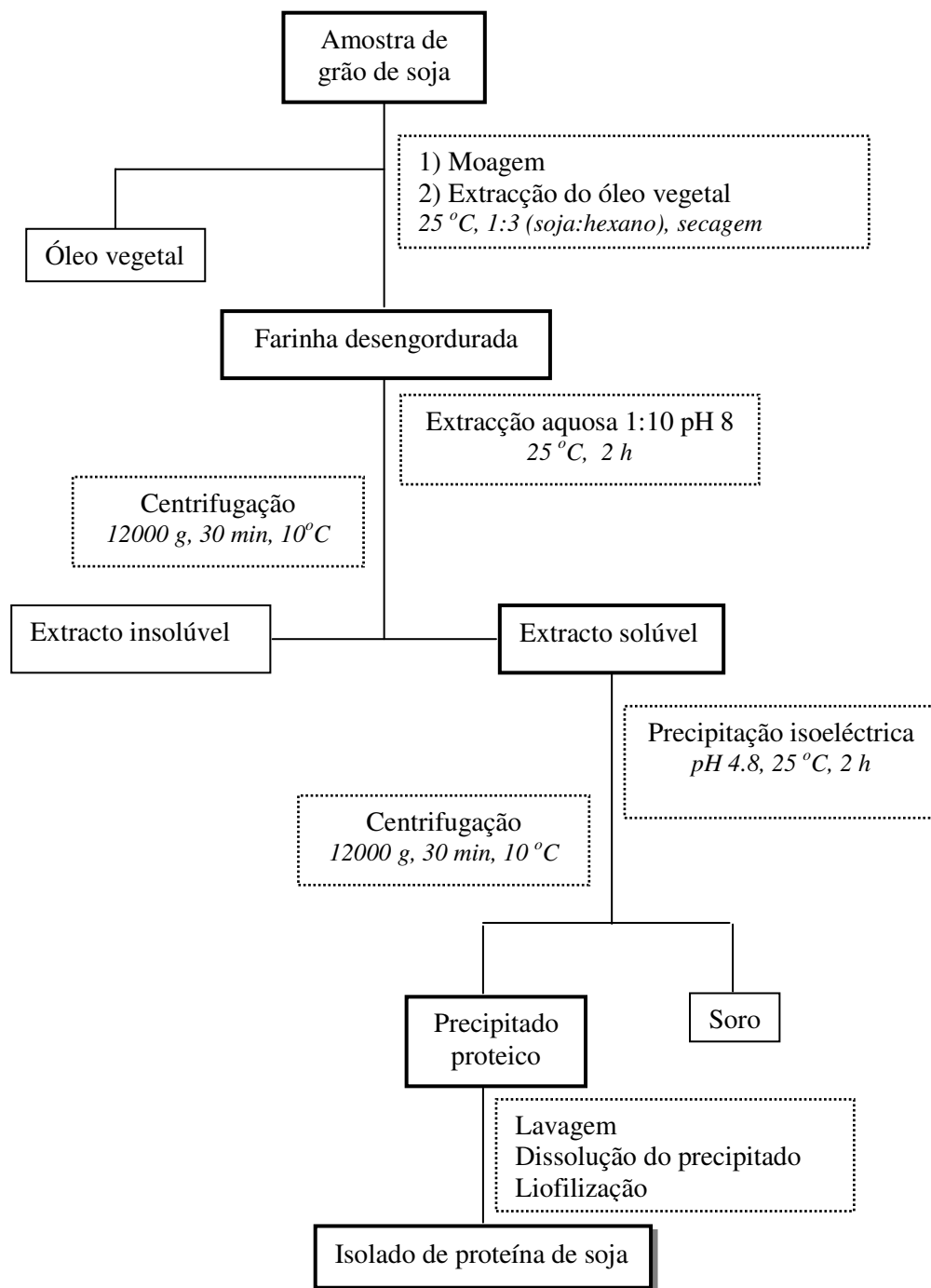


Figura 2.1 – Esquema representativo do procedimento de obtenção do isolado de proteína de soja

2.2.3 Caracterização físico-química dos IPS

2.2.3.1 Determinação de Cinzas e Humidade

O teor de humidade e cinzas dos IPS foi determinado de acordo com o “Food Chemicals Codex” (1981).

2.2.3.2 Teor lipídico

A determinação de lípidos foi efetuada num aparelho de Soxhlet (balão de fundo redondo de 250 mL, câmara de Soxhlet com 50 mL de capacidade, cartucho de 23 mm x 10 mm) com *n*-hexano durante 5 h a 80 °C em refluxo.

2.2.3.3 Teor proteico

A quantificação da proteína total dos IPS, laboratoriais e comerciais, foi determinada recorrendo a determinação de azoto total por análise elementar. As determinações foram realizadas em triplicado e a conversão de azoto total para proteína foi efetuada utilizando o fator de conversão convencional 6.25 (Norma Portuguesa nº 1996).

2.2.3.4 Composição proteica dos IPS

De forma a comparar a composição proteica de cada um dos IPS em estudo foram realizadas eletroforeses SDS-PAGE de acordo com o sistema de tampões descrito por Laemmli (1970).

O perfil electroforético das proteínas foi analisado a partir de alíquotas das dispersões previamente preparadas em água (1 h em agitação moderada), às quais foi adicionado tampão de amostra de eletroforese (Tris 62.5 mmol/L pH 6.8, SDS 2 % (m/v), glicerol 10 % (v/v), azul de bromofenol 0.01 % (m/v), com β -mercaptoetanol (β -ME) 5 % (v/v)) de forma a obter-se uma concentração proteica de 2.0 μ g/ μ L. As amostras assim preparadas

foram aquecidas a 100 °C por 5 min. Alíquotas de 10 µL de amostra foram aplicadas no gel.

As eletroforeses foram realizadas em equipamento BioRad, modelo Mini Protean II, a voltagem constante (150 V) em solução tampão de Tris-HCl 25 mmol/L, glicina 0.192 mol/L, e SDS 0.1 %, pH 8.3. Utilizou-se um gel de separação com 12.5 % de acrilamida (0.4 % de bis-acrilamida em Tris-HCl 1.5 mol/L, pH 8.8, na presença de SDS 0.1 % (m/v)) e um gel concentrador com concentração de 4 % de acrilamida (0.4 % de bis-acrilamida em Tris-HCl 0.5 mol/L, pH 6.8 na presença de SDS 0.1 % (m/v)). A polimerização dos géis foi iniciada com N,N,N',N' – tetrametiletenodiamina (TEMED) 42.5 mM e catalisada por persulfato de amónio (APS) 0.05 % (m/v).

A revelação das proteínas separadas por eletroforese foi efetuada utilizando o método de coloração com azul de Coomassie (R 250), recomendada para quantidades de proteína de cerca de 1 µg por banda. Utilizou-se uma solução deste corante a 0.25 % (m/v) em solução em água com metanol 25 % (v/v) e ácido acético 5 % (v/v), durante 20 a 30 min. Para a descoloração, os géis foram imersos numa solução de composição semelhante à descrita anteriormente, mas desta vez na ausência de corante. Após remoção da solução descorante, os géis foram mantidos em água destilada durante a noite.

A mobilidade electroforética das proteínas das amostras foi comparada com a mobilidade electroforética das seguintes proteínas de massa molecular conhecida (padrões), aplicados em todos os géis em volume igual ao das amostras: miosina (200 kDa), β -galactosidase (116.5 kDa), fosforilase b (97.4 kDa), albumina (66.2 kDa), ovalbumina do soro (45 kDa), anidrase carbónica (31 kDa), inibidor da tripsina (21.5 kDa), lisozima (14.4 kDa) e aprotinina (6.5 kDa) (Broad Range Markers da BioRad).

Para análise das imagens, cada gel foi digitalizado utilizando “*the calibrated imaging Gel-Doc*” da BioRad. A densitometria foi determinada utilizando o software *Quantity One v4.6* (BioRad) por quantificação da intensidade das bandas. A percentagem da área das subunidades α' , α e β da fração 7S e dos polipéptidos ácido (A) e básico (B) da fração 11S, em relação à área total, foi calculada a partir da densitometria dos géis de eletroforese das proteínas dos IPS em análise.

2.2.3.5 Turbidez das dispersões aquosas dos IPS

Prepararam-se dispersões dos IPS, em água ultrapura *Mili-Q*, com concentrações a variar entre 0.25 % e 1.00 % (m/v). As dispersões foram mantidas, sob agitação, por 1 h à temperatura ambiente e de seguida determinada a absorvância a 600 nm em espectrofotometro *JenWay 6405 UV/Vis*.

2.2.3.6 Solubilidade dos IPS

Prepararam-se dispersões dos IPS a 1.00 % (m/v) (Arrese *et al.*, 1991; Wagner *et al.*, 2000), em diferentes solventes: a) água ultrapura *Mili-Q*; b) solução tampão Tris-HCl 0.086 mol/L, glicina 0.09 mol/L, Na₂EDTA 0.004 mol/L (pH 8) (Tris/Gli); c) solução b) contendo ureia 6 mol/L e 0.5 % de dodecil sulfato de sódio (SDS) (T/U-SDS); d) solução c) contendo ditioneitol 10 mmol/L (DTT) (T/U-SDS/DTT). As dispersões permaneceram em agitação moderada durante 1 h à temperatura ambiente. De seguida, centrifugou-se a 10000 rpm (rotor 12159 Sigma), 20 °C por 15 min, recolheu-se o sobrenadante e a fração solúvel foi filtrada em papel Whatman nº 01.

A quantificação das proteínas solúveis, nos diferentes solventes, foi efetuada utilizando o método do ácido bicinconínico (BCA).

O reagente de BCA foi preparado apenas no momento da utilização por mistura dos reagentes comerciais do Kit Sigma: reagente A (constituído por BCA-Na₂ 1 % (m/v), carbonato de sódio 2 % (m/v), tartarato de sódio 0.16 % (m/v), hidróxido de sódio 0.4 % (m/v) e bicarbonato de sódio 0.95 % (m/v), pH 11.2) e reagente B (constituído por uma solução de sulfato de cobre penta-hidratado 4 % (m/v)), numa proporção de 50:1.

A 50 µL de sobrenadante foi adicionado 1 mL do reagente de BCA e a mistura agitada em vórtex e incubada 15 min a 60 °C. Em seguida, a absorvância foi medida a 562 nm (espectrofotómetro *Jenway 6405 UV/Vis spectrophotometer*). A estes valores de absorvância foi subtraída a absorvância do branco, o qual foi preparado por substituição do volume de sobrenadante por igual volume do correspondente solvente. A quantificação das proteínas foi efetuada com auxílio de uma curva de calibração utilizando soluções de

albumina de soro bovino de concentração conhecida (0.05 mg/mL a 0.5 mg/mL). Todos os ensaios foram efetuados em triplicado.

A solubilidade proteica foi expressa como a razão entre a proteína solúvel e a proteína total (determinada com base na análise elementar de cada IPS).

2.2.3.7 Grupos sulfidrilo livres (SH)

Os grupos sulfidrilo livres dos diferentes IPS foram determinados de acordo com o método descrito por Wang *et al.* (2008). Para cada amostra, dissolveu-se 5 mg do liofilizado em 5 mL de tampão contendo Tris-HCl 0.086 mol/L (pH 8), glicina 0.09 mol/L, EDTA 0.004 mol/L e ureia 8 mol/L. Uma alíquota (1.0 mL) da dispersão preparada foi misturada com 40 μ L de reagente de Ellman (5,5'-ditio-bis (ácido 2-nitrobenzóico) 4 mg/mL em metanol) e mantida 15 min à temperatura ambiente. A absorvância foi lida a 412 nm num espectrofotometro *Jenway 6405 UV/Vis spectrophotometer*. O conteúdo em grupos SH livres foi determinado aplicando o coeficiente de extinção molar de 13600 mol⁻¹.L.cm⁻¹ (Shimada e Cheftel, 1988). Cada amostra foi determinada em triplicado.

2.2.3.8 Análise dos IPS por espectroscopia de infravermelho (FT-IR)

Os espectros de FTIR das diferentes amostras foram adquiridos num espectrómetro Bruker IFS com acessório Golden Gate (sistema de ATR de reflexão única), na gama de número de onda entre 4000 e 500 cm⁻¹, com resolução de 8 cm⁻¹ e com acumulação de 132 scans. Para cada isolado foram obtidas, no mínimo, cinco réplicas. Os espectros de FT-IR foram submetidos a análise em componentes principais (PCA) com o software CATS desenvolvido por Barros (1999).

2.2.3.9 Composição proteica das frações solúveis dos IPS

A técnica de eletroforese SDS-PAGE foi realizada de acordo com o procedimento descrito na secção 2.2.3.4.

O perfil electroforético das proteínas solúveis em água, tampão Tris/Gli/ureia/SDS e tampão Tris/Gli/ureia/SDS/DTT, foi analisado a partir de alíquotas das dispersões previamente preparadas (1 h em agitação, centrifugadas a 10000 rpm, 20 °C por 15 min e

recuperação do sobrenadante), às quais foi adicionado tampão de amostra de eletroforese (Tris-HCl 62.5 mmol/L pH 6.8, SDS 2 % (m/v), glicerol 10 % (v/v) e azul de bromofenol 0.01 % (m/v), de forma a obter-se uma concentração de 2.0 µg/µL.

2.2.3.10 Análise térmica por calorimetria diferencial de varrimento

Dispersões de IPS preparadas à concentração de 12 % (m/v) em água ultrapura *Mili-Q* foram seladas hermeticamente em cápsulas de alumínio. Os termogramas foram adquiridos num calorímetro *Power Compensation Diamond DSC* (Perkin-Elmer), no intervalo de temperaturas entre 30 ° e 110 °C, a uma taxa de variação de 10 °C/min, utilizando-se como referência uma cápsula vazia. A calibração da temperatura foi efetuada com padrões de índio e zinco. A entalpia de transição (ΔH) e a temperatura de desnaturação (T_d) foram calculadas por *software Pyris* (Perkin-Elmer) do calorímetro após definição manual do início e do final das zonas de transição. A concentração proteica rigorosa foi determinada por resíduo seco da solução aquosa.

2.2.4 Caracterização reológica dos géis dos IPS

2.2.4.1 Preparação das dispersões de IPS

As dispersões de IPS foram preparadas por adição da quantidade apropriada de IPS a água ultrapura sob agitação magnética lenta, de forma a obter-se uma dispersão a aproximadamente 13 % (m/v). Adicionou-se azida de sódio (0.02 %) como conservante, de forma a evitar o desenvolvimento microbiano.

Após agitação por 1 h a 4 °C, o pH foi ajustado, à temperatura ambiente, para 7.0. A dispersão de IPS foi mantida a 4 °C com agitação moderada, durante uma noite, para maximizar a dissolução das proteínas e no final retificou-se o pH. A concentração das dispersões de IPS iniciais foi determinada por resíduo seco a 105 °C.

Previamente à realização do ensaio reológico, as dispersões foram diluídas para 11 % com água ultrapura, agitadas por 20 min e desgaseificadas sob vácuo por 30 min com agitação lenta.

2.2.4.2 Ensaios não isotérmicos

Os ensaios não isotérmicos foram efetuados em reómetro de tensão controlada Bohlin CVO HR 120 com um sistema de medição placa-placa, utilizando uma placa superior rugosa com um raio de 20 mm, a uma distância ou *gap* de 1 mm da placa inferior. Este reómetro está equipado com um sistema Peltier que permitiu um eficaz controlo de temperatura, assim como uma variação rápida dos valores da temperatura, quando pretendido.

Após degaseificação, as amostras foram imediatamente transferidas para a placa do reómetro, ligeiramente aquecida (40 °C) e o ensaio efetuado por aquecimento da solução até 95 °C, a uma taxa de 1 °C/min, a uma amplitude de deformação de 1 % (determinada a partir de ensaios preliminares de varrimento em deformação) e a uma frequência de oscilação de 5 rad/s. A temperatura de 95 °C foi mantida por 5 min. Posteriormente, as amostras foram submetidas a um varrimento em temperatura decrescente, de 95 ° até 20 °C, a uma taxa variação de 1 °C/min, à mesma taxa de deformação e frequência. Uma vez atingida a temperatura de 20 °C, sem evolução significativa dos módulos viscoelásticos, foi realizado um varrimento em frequência entre 0.05 e 50 rad/s.

Durante estes ensaios registou-se a evolução dos valores do módulo de armazenamento e do módulo de perda.

2.2.4.3 Ensaios isotérmicos

Os testes de formação e maturação dos géis sob condições isotérmicas foram efetuados num reómetro TA AR-1000 com um sistema de medição cone (40 mm de diâmetro, ângulo de 4 ° e 92 µm de truncação) – placa.

Uma vez preparada a amostra, procedeu-se rapidamente à sua transferência para a placa fixa do reómetro, previamente aquecida a 40 °C, e elevou-se a temperatura, rapidamente, até 80 °C. A evolução dos módulos viscoelásticos foi registada durante 3 h a 80 °C, sujeitando a amostra a 1 % de deformação e a uma frequência de oscilação de 5 rad/s.

Após maturação do gel, efetuou-se um varrimento em frequência a 80 °C, na gama de frequências 0.05-50 rad/s, sendo a taxa de deformação imposta ao sistema a mesma que foi utilizada nos restantes ensaios.

Em todos os ensaios efetuados, quer isotérmicos, quer não isotérmicos, a superfície da amostra exposta foi coberta por uma fina camada de óleo mineral de baixa viscosidade, a fim de evitar qualquer evaporação de solvente.

Todos os ensaios foram realizados, no mínimo, em duplicado.

2.2.4 Análise estatística

Os resultados das determinações efetuadas foram expressos em termos das médias das três réplicas e dos respetivos desvios-padrão, à exceção dos obtidos por análises reológicas. Os valores médios obtidos foram comparados recorrendo ao teste *t-student*. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0.05$.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Composição dos IPS

A composição dos IPS obtidos laboratorialmente (IPS 1, IPS 2, IPS 3, IPS 4) e dos comerciais (IPS 5, IPS 6) é apresentada nas Tabela 2.1 e 2.2.

Segundo Petruccelli e Añón (1994), a composição dos IPS pode variar em função de uma série de fatores: variedade da soja, condições do meio de cultivo e do processo de obtenção do isolado. Contudo, os valores médios determinados para os parâmetros analisados (teor proteico, lipídico, humidade, cinzas e composição proteica) dos IPS estão de acordo com a gama de valores descritos na literatura (Liu, 1997; Henn e Neto, 1998; Hua *et al.*, 2005).

Embora não se detetem diferenças muito acentuadas nos valores de cinzas, humidade e lípidos entre as amostras de IPS laboratoriais e as comerciais é possível, no entanto, observar uma ligeira tendência para valores superiores no caso das amostras comerciais, os quais poderão estar relacionados com a variedade de soja, diferentes condições de cultivo ou diferenças nos processos de obtenção. Por outro lado, constata-se que o IPS 1 tem um conteúdo em cinzas ligeiramente superior aos restantes IPS laboratoriais, aproximando-se dos IPS comerciais. Este resultado poderá ter resultado da contribuição de alguns resíduos da casca dos grãos de soja, aumentando assim o resíduo inorgânico deste IPS.

Tabela 2.1- Teor em cinzas, humidade e lípidos dos IPS obtidos a partir de diferentes matérias-primas

Amostra	Cinzas (%)	Humidade (%)	Lípidos (%)
IPS 1	3.2 ± 0.3 ^a	2.1 ± 0.1 ^a	0.9 ± 0.2 ^a
IPS 2	2.8 ± 0.2 ^a	1.8 ± 0.2 ^a	0.9 ± 0.3 ^a
IPS 3	3.0 ± 0.1 ^a	2.0 ± 0.2 ^a	0.8 ± 0.1 ^a
IPS 4	2.9 ± 0.4 ^a	1.7 ± 0.3 ^a	1.9 ± 0.4 ^b
IPS 5	3.7 ± 0.6 ^b	3.7 ± 0.2 ^b	1.1 ± 0.2 ^a
IPS 6	3.5 ± 0.6 ^b	3.5 ± 0.3 ^b	1.2 ± 0.1 ^a

Os resultados correspondem a valores médios e desvios padrão de três réplicas relativamente a massa total de amostra. Valores médios da mesma coluna seguidos do mesmo sobrescrito não são significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Contrariamente ao que poderia ser esperado, o isolado laboratorial com maior teor lipídico é o IPS 4. Na realidade este isolado foi obtido a partir do resíduo industrial da extração do óleo de soja, pelo que o seu maior teor lipídico traduzirá uma maior eficiência do processo laboratorial de extração de lípidos.

Pela análise da Tabela 2.2 pode-se verificar que os IPS 3 e 4 são os que apresentam menor conteúdo proteico seguidos pelos isolados comerciais. Estes resultados sugerem que os tratamentos industriais aplicados, sendo mais severos, promovem perda de proteína.

Tabela 2.2 – Composição proteica dos IPS obtidos a partir de diferentes matérias-primas.

Amostra	Teor Proteico (%)	Composição (%)		Razão 11S/7S
		7S	11S	
IPS 1	95.6 ± 0.3 ^a	44.3 ± 2.2 ^a	55.7 ± 2.8 ^a	1.26 ± 0.12 ^a
IPS 2	92.8 ± 0.1 ^b	45.0 ± 2.8 ^a	55.0 ± 2.7 ^a	1.22 ± 0.14 ^a
IPS 3	88.2 ± 0.4 ^c	45.0 ± 1.9 ^a	55.0 ± 2.1 ^a	1.22 ± 0.08 ^a
IPS 4	88.2 ± 0.2 ^c	45.9 ± 2.6 ^a	54.1 ± 2.4 ^a	1.18 ± 0.12 ^a
IPS 5	90.6 ± 0.1 ^d	47.3 ± 2.1 ^a	52.7 ± 2.6 ^a	1.11 ± 0.10 ^a
IPS 6	91.0 ± 0.3 ^d	46.8 ± 2.4 ^a	53.2 ± 2.3 ^a	1.14 ± 0.11 ^a

Os resultados correspondem a valores médios e desvios padrão de três réplicas. Valores médios da mesma coluna seguidos do mesmo sobrescrito não são significativamente diferentes ($p < 0.05$).

As composições relativas das globulinas 7S e 11S (Tabela 2.2) foram calculadas a partir dos valores de densitometria dos géis de eletroforese realizada de acordo com a secção 2.2.3.4.

A composição relativa da globulina 7S foi calculada como a soma das subunidades α , α' e β enquanto que a da globulina 11S como a soma dos polipeptídeos ácidos e básicos.

No que se refere à composição proteica é possível constatar que a quantidade da fração 11S é ligeiramente superior à da fração 7S, principalmente nos isolados extraídos laboratorialmente e a razão 11S/7S varia entre 1.11 e 1.26, o que está de acordo com os intervalos normalmente determinados para IPS de diferentes cultivos (0.5-1.7) (Hua *et al.*, 2005). Contudo, não se observam diferenças significativas no conteúdo das frações 7S e 11S entre os diferentes IPS.

Assim, os resultados obtidos sugerem que a origem/variedade da soja e/ou o diferente processamento não alteraram significativamente a quantidade das frações constituintes dos IPS.

2.3.2 Turbidez das dispersões aquosas dos IPS

De forma a estimar o grau de agregação das moléculas proteicas foi determinada a turbidez das dispersões aquosas em função da concentração dos diferentes IPS em estudo (Figura 2.2). De acordo com o esperado, o aumento da concentração proteica resultou no aumento significativo da turbidez de todos os isolados.

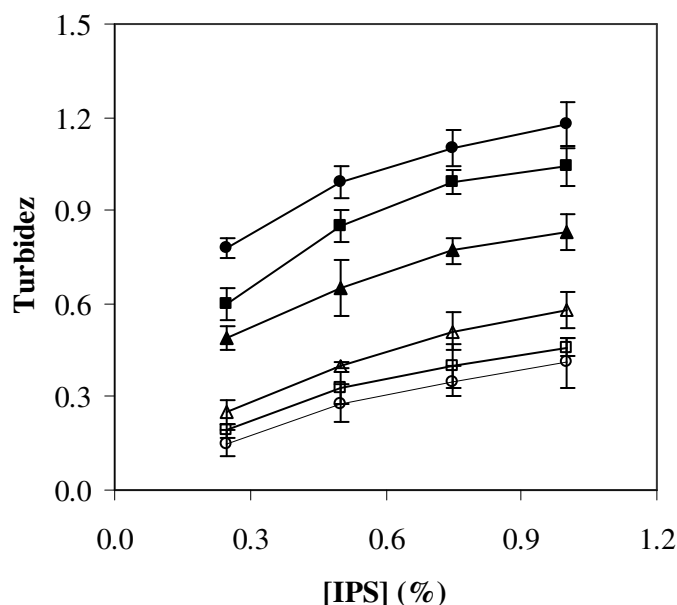


Figura 2.2 – Turbidez das dispersões aquosas dos IPS em função da concentração proteica IPS 1 (○), IPS 2 (□), IPS 3 (△), IPS 4 (▲), IPS 5 (■) e IPS 6 (●)

De forma a comparar a magnitude da dependência da turbidez com a concentração aplicou-se uma relação de potência aos dados apresentados e o expoente obtido permitiu inferir sobre o declive correspondente. Com base na dependência da turbidez face à concentração pode-se definir dois grupos de isolados, um formado pelos isolados laboratoriais, IPS 1, 2 e 3, com declives a variar entre 0.73 e 0.62, e outro grupo que inclui o IPS 4 e os isolados comerciais, para os quais o declive variou entre 0.41 e 0.30.

As amostras comerciais apresentaram maior turbidez do que as amostras laboratoriais sugerindo que as primeiras possuem maior grau de agregação, o que pode facilmente ser entendido tendo em conta o processamento industrial mais severo aplicado a estas amostras com o objetivo de garantir a remoção de lípidos e de substâncias responsáveis por sabores indesejáveis. Estes tratamentos possivelmente provocaram a desnaturação das proteínas e a sua consequente agregação.

Alguns investigadores (Boatright e Hettiarachchy, 1995) mostraram que a presença de lípidos na farinha de soja, ainda que residuais, provoca alterações nas propriedades das proteínas uma vez que passam a estar mais sujeitas a reações de polimerização induzidas por radicais livres derivados da peroxidação dos lípidos aumentando assim a formação de agregados e consequentemente a turbidez. Contudo, para além dos IPS comerciais não possuem teores lipídicos significativamente superiores aos dos restantes isolados, são processados a altas temperaturas diminuindo drasticamente a atividade das lipoxigenases, o que não justifica os valores superiores de turbidez para os IPS comerciais.

Analisando os isolados laboratoriais, verifica-se que o IPS 4, obtido a partir de farinha de soja desengordurada e seca (100 °C), é o que apresenta maior turbidez. Tendo em conta a temperatura de processamento industrial aplicada às matérias-primas, os valores de turbidez estão de acordo com o esperado: IPS 1 e 2 possuem menor agregação do que os isolados comerciais e do que o IPS 4 e o IPS 3, obtido a partir de matérias-primas, processadas industrialmente a 80 °C, apresenta maior turbidez do que os IPS 1 e 2.

Assim, os resultados permitem inferir que os isolados obtidos a partir de grãos de soja e grão de soja laminados são constituídos por proteínas com menor tendência para sofrer agregação, em solução aquosa, ou que possuem menor quantidade de agregados pré-formados possivelmente porque as matérias-primas que lhes deram origem foram processadas a temperaturas inferiores ou próximas da temperatura de desnaturação da globulina 7S, o que poderá promover a destabilização de ligações intra ou intermoleculares

diminuindo assim o tamanho e/ou o número de agregados naturalmente existente. Por outro lado, o IPS 4 obtido a partir de matéria-prima processada a 100 °C e os IPS comerciais apresentaram turbidez significativamente maior do que os restantes isolados sugerindo que IPS obtidos a partir de matérias-primas processadas a temperaturas superiores às temperaturas de desnaturação das principais globulinas da soja, apresentam maior quantidade de agregados, de maior massa molecular, resultantes da formação de novas ligações. Estes resultados corroboram com o estudo sobre agregação térmica dos IPS realizado por Petruccelli e Añón (1995) onde se demonstrou que a agregação das subunidades ácidas e básicas da glicinina dos IPS ocorreu em tratamentos térmicos a temperaturas superiores a 85 °C.

2.3.3 Solubilidade dos IPS

A solubilidade dos IPS foi determinada em diferentes meios, conforme descrito previamente (§ 2.2.3.6), em água ultrapura (AG), em solução tampão Tris/HCl a pH 8, em T/U-SDS onde a ureia e o SDS atuam como agentes desnaturantes e em T/U-SDS/DTT onde o ditioneitol atua como um agente redutor. Pretendeu-se com esta estratégia, não só avaliar a solubilidade dos IPS em diferentes solventes, mas também conseguir informação acerca do tipo de interações que estão associadas à menor ou maior solubilidade destas amostras e do tipo de interações responsáveis pela formação dos agregados referidos anteriormente.

A solubilidade dos IPS nos diferentes meios pode ser observada na Figura 2.3. Em relação à solubilidade em AG e Tris/Gli, distinguem-se essencialmente dois grupos: (1) isolados laboratoriais e (2) isolados comerciais. As diferenças entre os dois grupos relacionam-se com a menor solubilidade do segundo grupo. As diferenças entre as solubilidades em água e Tris/Gli dos IPS laboratoriais não são estatisticamente significativas, embora se verifique uma tendência para uma maior solubilidade dos IPS 2 e 3. O maior valor da solubilidade do IPS 2 poderá resultar do menor grau de agregação nestes IPS e/ou do menor tamanho dos seus agregados em consequência da temperatura de processamento industrial da matéria-prima. Estes resultados poderão estar relacionados com o tipo de processamento industrial a que as matérias-primas foram submetidas: tendo sido o IPS 3 obtido a partir de matérias-primas processadas a 80 °C, temperatura superior à T_d da β -conglucina, a

ocorrência de desnaturação parcial das proteínas constituintes deste isolado, como se pode concluir pelos resultados obtidos por DSC (apresentados na secção 2.3.7), pode ter levado à interação entre moléculas promovendo a agregação e a insolubilização parcial das proteínas. O aumento da temperatura de processamento provocou a diminuição da solubilidade, como se constata pela menor solubilidade do IPS 4 comparativamente com os restantes IPS laboratoriais.

Os IPS comerciais apresentam valores de solubilidade, em água, próximos de 39 %, valores ligeiramente inferiores aos dos restantes isolados, com solubilidades a variar entre 53 e 63 %. Os resultados obtidos estão em concordância com os reportados por Wagner *et al.* (2000). O isolado obtido laboratorialmente com menor solubilidade em água foi o IPS 4, o que possivelmente se relaciona com a maior desnaturação das proteínas constituintes deste isolado, conforme evidenciado pela análise térmica dos isolados proteicos, como resultado da aplicação de temperaturas superiores (100 °C) durante o processamento industrial da respetiva matéria-prima. A interação entre as moléculas proteicas deste isolado favoreceu a agregação, como se verificou pelos valores superiores de turbidez e originou uma maior insolubilização das proteínas constituintes do IPS 4.

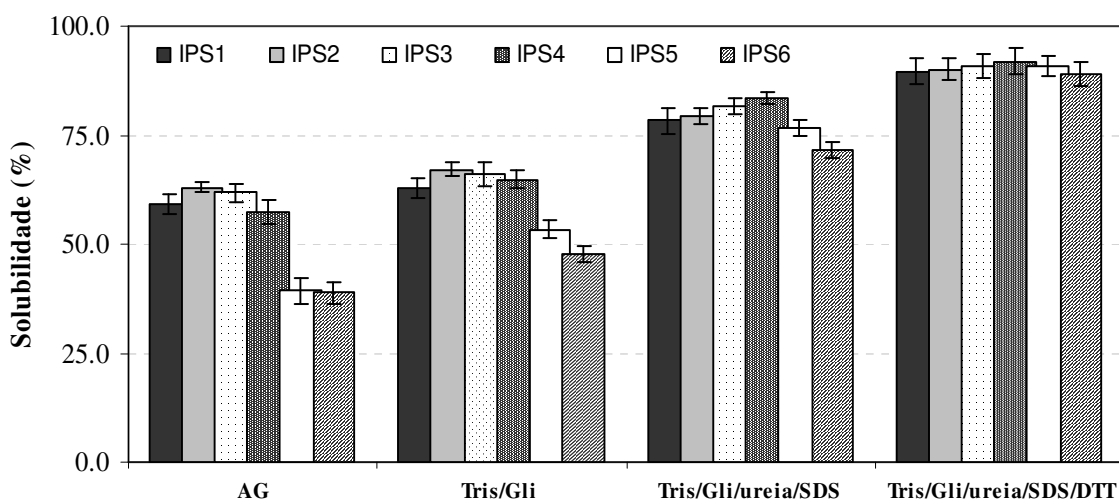


Figura 2.3 – Solubilidade dos IPS, obtidos laboratorial e comercialmente, em diferentes solventes, AG, Tris/Gli, T/U-SDS e T/U-SDS/DTT. Os resultados correspondem a valores médios e desvios padrão de três réplicas.

Os agregados existentes nos IPS de maior turbidez, IPS 4 e IPS comerciais, relacionados com a menor solubilidade destes isolados, serão formados principalmente via interações hidrofóbicas pois romperam-se parcial ou totalmente por ação dos agentes desnaturantes (ureia e SDS), resultando num aumento de solubilidade entre 20 % e 33 %, respetivamente, para IPS 4 e IPS 6, diminuindo assim a diferença de solubilidade entre os dois grupos no solvente T/U-SDS. O aumento de solubilidade com a mudança de solvente de AG para Tris/Gli foi também mais significativo nos isolados comerciais sendo indicativo da maior predominância de interações eletrostáticas nos agregados destes isolados do que nos isolados laboratoriais.

O papel das pontes dissulfureto na agregação e consequentemente na solubilidade dos isolados foi investigado por adição de DTT. Os resultados mostraram que a adição de DTT aumentou a solubilidade de todos os isolados embora a intensidade desse efeito tenha sido mais acentuada para os isolados comerciais, o que revela maior abundância de pontes dissulfureto nestes isolados do que nos laboratoriais.

Em suma, os resultados permitem concluir que as diferenças de solubilidades registadas entre os IPS em estudo resultam predominantemente do efeito da intensidade/quantidade de interações hidrofóbicas e da contribuição de pontes dissulfureto existentes entre as moléculas proteicas dos isolados. O diferente grau de desnaturação e a possibilidade de se estabelecerem diferentes interações, em diferentes extensões, reflete o efeito das diferentes condições de processamento aplicadas às matérias-primas a partir das quais se obtiveram os IPS.

2.3.4 Grupos sulfidrilo livres dos IPS

A Figura 2.4 mostra os valores dos grupos SH livres dos IPS laboratoriais (1, 2, 3 e 4) e comerciais (5 e 6).

Segundo Petruccelli e Añón (1994), o conteúdo dos grupos SH para IPS não tratados varia entre 1.5 e 1.8 $\mu\text{mol SH/g}$ proteína.

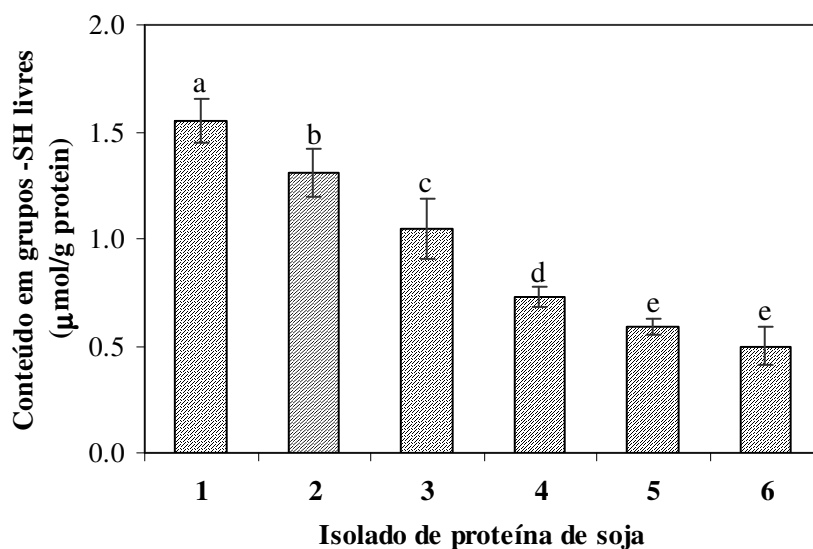


Figura 2.4 – Conteúdo em grupos sulfidrilo livres (SH) dos IPS

De um modo geral, os teores de SH livres dos IPS 1 e 2 foram superiores aos dos isolados 3 e 4 e isolados comerciais. O conteúdo em grupos SH livres diferiu significativamente entre todos os IPS laboratoriais e entre estes e os comerciais embora não se registem diferenças significativas no conteúdo em SH livres dos IPS 5 e 6.

Os dados obtidos mostram que o IPS 1 apresenta um conteúdo em grupos SH livres de, aproximadamente, 1.6 $\mu\text{mol SH/g}$ proteína, sendo a amostra que mais se aproxima do valor de referência anteriormente mencionado, ao passo que o IPS 4 é o que possui menor teor em SH livres (0.7 $\mu\text{mol SH/g}$ proteína). Por outro lado, o conteúdo em SH livres dos IPS 3 e IPS 4 sugere que nas matérias-primas que sofreram extração em solvente orgânico a 80 °C, com ou sem aquecimento até 100 °C, ocorreram reações de agregação entre moléculas proteicas, como já anteriormente proposto, o que provavelmente resultou no decréscimo dos grupos SH livres. Petruccelli e Añón (1994) observaram a diminuição de 1.3 $\mu\text{mol SH/g}$ proteína para valores inferiores a 0.8 $\mu\text{mol SH/g}$ proteína por aplicação de tratamento térmico a 80 °C, pH 7.

Assim, os resultados obtidos sugerem a existência de uma relação entre a temperatura de processamento da matéria-prima e o conteúdo em grupos SH livres, justificando as diferenças obtidas para os diferentes IPS laboratoriais. O aumento da temperatura do processamento industrial resulta no decréscimo do conteúdo de SH livres dos isolados proteicos, possivelmente, por favorecimento da oxidação dos grupos SH e/ou reações de

agregação proteica nos IPS. A avaliação da solubilidade nos diferentes meios de extração permite corroborar estas hipóteses constatando-se que, no decurso dos tratamentos aplicados às matérias-primas, houve agregação estabilizada por pontes dissulfureto e, para além disso, a contribuição destas interações é tanto maior quanto mais severo for o processamento aplicado.

2.3.5 Análise dos IPS por espectroscopia de infravermelho (FT-IR)

A espectroscopia de infravermelho foi aplicada aos IPS para avaliar a eficiência de extração lipídica e para caracterizar estruturalmente os IPS em estudo. A gama de comprimento de onda analisada permitiu avaliar a presença de proteínas, lípidos e polissacarídeos nos isolados em análise.

2.3.5.1 Avaliação da eficiência da remoção laboratorial do óleo de soja

A Figura 2.5 apresenta os espectros de FT-IR das matérias-primas e dos respectivos IPS obtidos laboratorialmente.

De acordo com o esperado, o pico situado aproximadamente a 1735 cm^{-1} , correspondente aos lípidos, é menor nos IPS do que nas matérias-primas. Logicamente, a diminuição de intensidade do pico é mais significativa no caso do grão de soja e grão de soja laminado (Figura 2.4 A e B) pois correspondem às matérias-primas que ainda continham o óleo natural. A eficiência de extração laboratorial do óleo de soja rondou os 95 %. Curiosamente, nos espectros de FT-IR da farinha de soja desengordurada e da farinha de soja desengordurada e seca (Figura 2.4 C e D), é ainda possível identificar a existência do pico característico dos lípidos, o que sugere que, nestas amostras, a remoção industrial do óleo não foi 100 % eficiente. Por outro lado, constata-se que a extração do IPS permitiu remover a maioria dos polissacarídeos sendo os picos correspondentes às proteínas, região amida I e II, os predominantes dos espectros de FT-IR dos isolados.

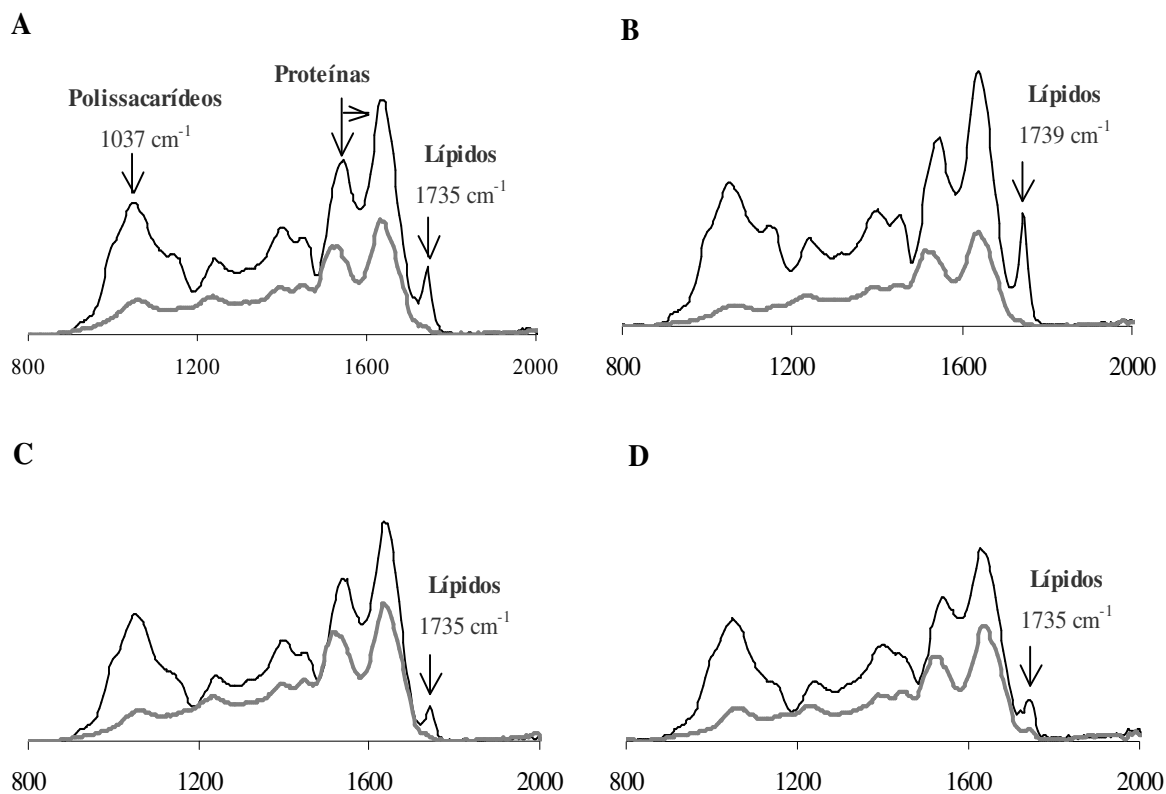


Figura 2.4 – Espectros de FT-IR das matérias-primas (linhas pretas finas) e dos respectivos IPS (linhas cinzentas grossas). A – Espectros referentes ao grão de soja moído e respetivo IPS; B – espectros referentes ao grão de soja laminado e respetivo IPS; C- espectros referentes à farinha de soja desengordurada e respetivo IPS; D – espectros referentes à farinha de soja seca e respetivo IPS.

A Figura 2.5 permite comparar os espectros de FT-IR de todos os IPS em estudo constatando-se que, em todos os casos, as proteínas são os constituintes principais dos isolados.

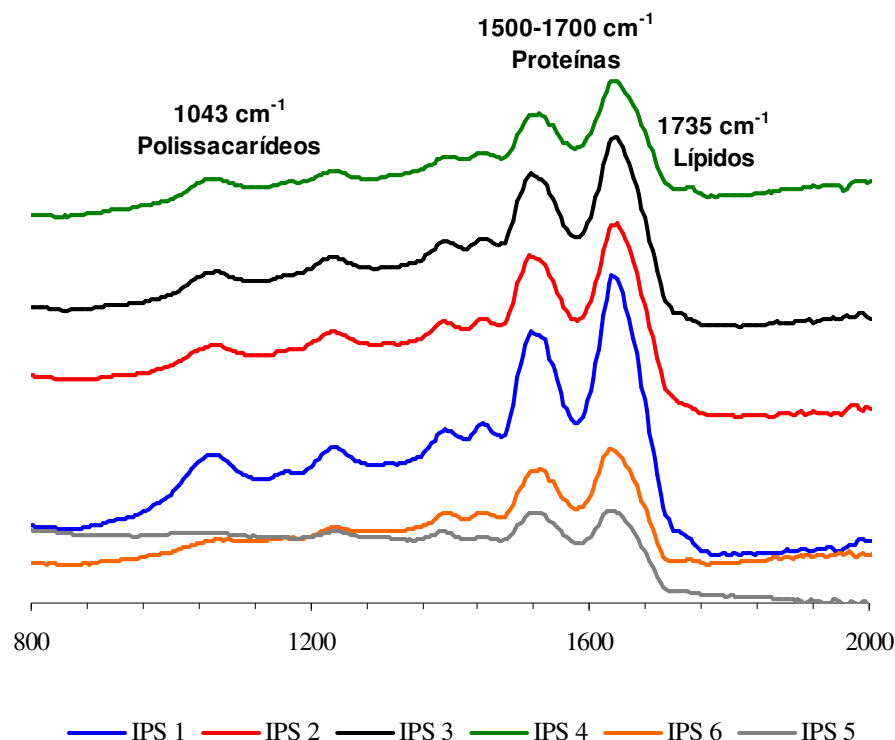


Figura 2.5 – Comparação dos espectros de FT-IR dos IPS laboratoriais e comerciais em estudo

2.3.5.2 Caracterização estrutural dos IPS por FT-IR

Em termos de caracterização dos IPS, a Figura 2.6 mostra a região amida I desconvoluída dos espectros do IPS 1, IPS 4 e IPS 5, os quais apresentam diferenças consideráveis. A região amida I dos IPS 2, 3 e 6 não foi apresentada pois não revelou diferenças significativas relativamente à região apresentada para os IPS 1 e 5, respetivamente. A região amida I, compreendida entre, $1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$, é a mais importante para o estudo das propriedades estruturais das proteínas. Contudo, as bandas originadas pelos diferentes elementos constituintes da estrutura secundária sobrepõem-se, tornando-se necessário separá-los. Para o efeito foi aplicado, com o *software OPUS versão 5.0* (Bruker, Alemanha), o processo de desconvolução sugerido por outros autores (Lefèvre e Subirade, 2001; Alvarez *et al.*, 2008; Tang e Ma, 2009) com fator de desconvolução de 75 e fator de redução de ruído de 10 e formato de curva Gaussiana (largura de banda 0.69 e aumento de resolução de 12.09).

Analisando a região amida I é possível identificar cinco bandas as quais, de acordo com Tang e Ma (2009), podem ser atribuídas da seguinte forma: a 1691 cm^{-1} , correspondente a

estruturas tipo voltas β (β -type turn and bend); a banda a 1681 cm^{-1} , corresponde a folhas β intermoleculares resultantes da agregação entre componentes da proteína e é normalmente designada banda de agregação; a banda a 1662 cm^{-1} corresponde a voltas β ; a 1643 cm^{-1} , estruturas desordenadas (random coils) e a 1631 cm^{-1} , estruturas em folha β antiparalelas.

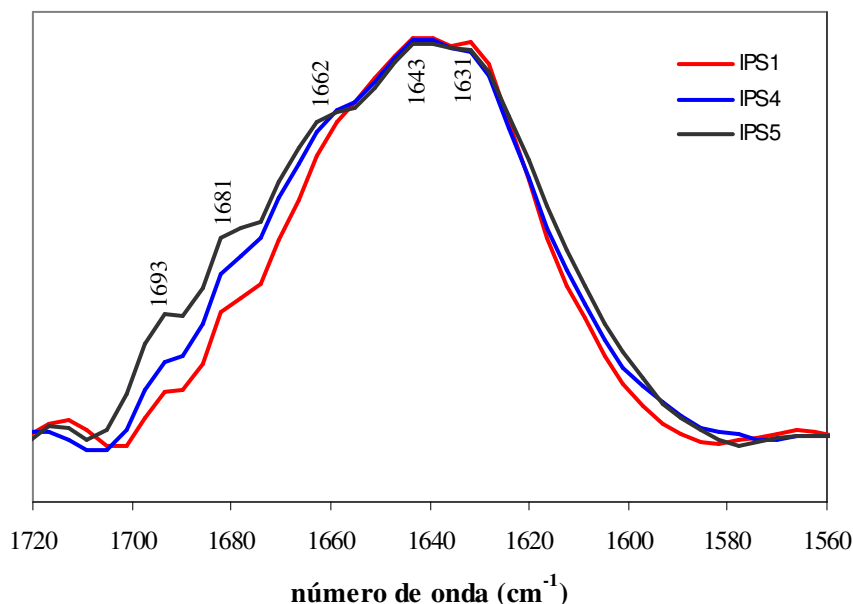


Figura 2.6 – Região Amida I desconvoluída dos espectros de FT-IR dos IPS 1, IPS 4 e IPS 5

A Figura 2.6 apresenta a região Amida I dos espectros desconvoluídos dos IPS 1, 4 e 5 verificando-se que a nível estrutural, os três isolados diferenciam-se essencialmente pelas bandas localizadas a 1693 , 1681 e 1662 cm^{-1} . A intensidade da banda localizada a 1681 cm^{-1} , correspondente aos processos de agregação é menor para o IPS 1 seguida do IPS 4 e por fim do IPS 5 sugerindo que a agregação é mais intensa nos isolados com processamentos mais severos sendo as estruturas β -type turn and bend mais abundantes no IPS 5 do que nos restantes isolados. A semelhança entre as bandas situadas a 1643 cm^{-1} refletem processos de desnaturação ocorridos nos três IPS. Os espectros dos restantes isolados são intermédios aos apresentados e de forma a facilitar a interpretação da figura não foram colocados.

Devido à dificuldade em comparar e identificar pequenas diferenças entre os espectros de FT-IR dos diferentes IPS em estudo, os referidos espectros foram submetidos a análise em componentes principais (PCA), de modo a corroborar os resultados obtidos por

desconvulsão dos referidos espectros. A análise em componentes principais é um método matemático qualitativo de reorganizar a informação de um conjunto de dados de amostragem. Torna-se muito útil quando o conjunto de amostras possui informação de um grande número de variáveis, como nos dados espectroscópicos. O que um PCA faz é descobrir novas variáveis, isto é, os “componentes principais” (PCs), que consigam reunir a maioria da variabilidade dos dados.

A análise do diagrama de coordenadas fatoriais (Figura 2.7) revela a existência de dois grupos, separados pelo eixo do PC2. A estes dois grupos correspondem os isolados comerciais, situados na parte positiva do eixo e os isolados laboratoriais, situados na parte negativa do eixo PC2. Verifica-se ainda que entre os isolados extraídos laboratorialmente, o IPS 4 localiza-se no eixo PC3 positivo, tal como os isolados comerciais, o que sugere uma aproximação do IPS 4 aos IPS comerciais. Os restantes isolados laboratoriais agrupam-se, essencialmente, no eixo PC3 negativo afastando mais das propriedades dos isolados comerciais.

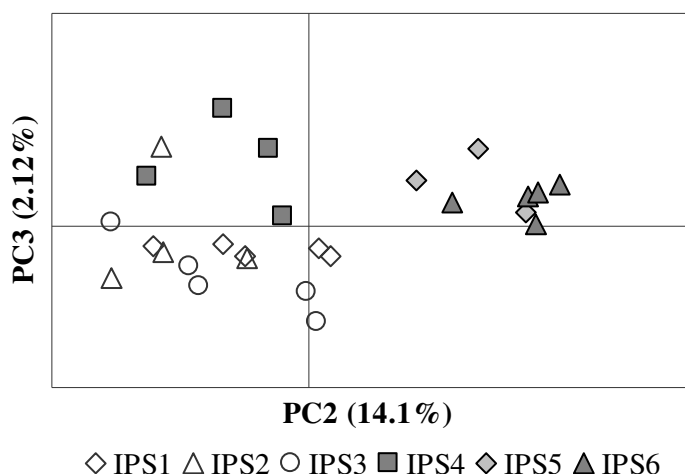


Figura 2.7 – Diagrama de coordenadas fatoriais de PC2 vs PC3 para os isolados laboratoriais e comerciais.

Da projeção das contribuições fatoriais correspondentes ao PC2 (Figura 2.8 A), pode verificar-se que os isolados comerciais são caracterizados principalmente por uma banda localizada a 1617 cm^{-1} , evidenciando a existência de estruturas agregadas (Tang e Ma, 2009) e por bandas localizadas a 1566 , 1550 e 1531 cm^{-1} , correspondentes à região amida II. Por outro lado, a análise da Figura 2.8 B permite deduzir que os isolados comerciais e o IPS 4 são discriminados dos restantes isolados laboratoriais, pelo eixo PC3, pelas bandas

localizadas a 1660 e a 1619 cm^{-1} , atribuídas, respetivamente, a ligações de hidrogénio intermoleculares entre folhas β (Lefèvre e Subirade, 2001) e a estruturas agregadas.

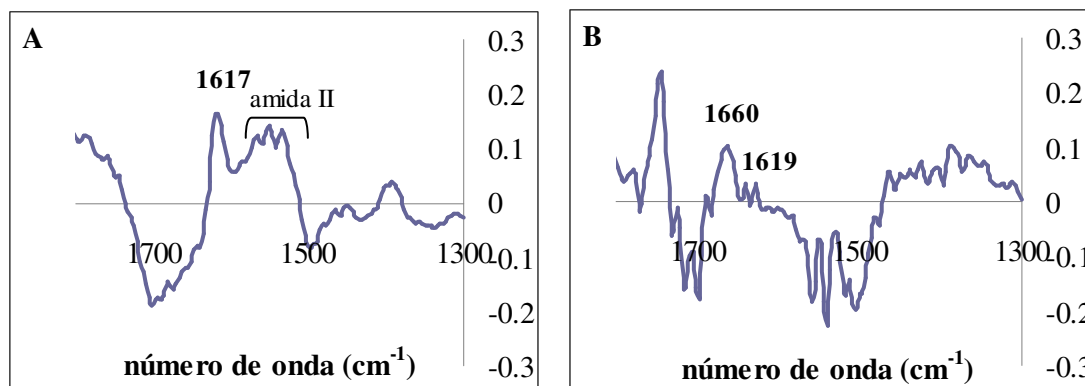


Figura 2.8 – Diagrama de contribuições fatoriais do PC2 (A) e do PC3 (B) para os isolados laboratoriais e comerciais

Os resultados de quimiometria permitiram assim corroborar as conclusões obtidas por desconvolução dos espectros de FT-IR dos isolados em estudo, revelando que as amostras comerciais diferenciam-se das laboratoriais essencialmente devido ao grau de agregação proteica e também a diferenças na estrutura terciária (amida II). A nível estrutural, o isolado laboratorial IPS 4 é o que mais se aproxima das amostras comerciais, diferenciando-se dos restantes isolados laboratoriais pelo estado de agregação.

2.3.6 Composição da fração solúvel dos IPS

A composição da fração solúvel, em diferentes solventes, foi analisada por SDS-PAGE não redutora (Figura 2.9). A atribuição das bandas foi efetuada por comparação entre os marcadores de massa molecular (MM) e os padrões das frações proteicas da soja descritos na literatura (Arrese *et al.*, 1991; Molina *et al.*, 2001).

Para os diferentes IPS em estudo, foram identificadas as principais globulinas constituintes da proteína de soja e foram estimadas as suas massas moleculares: subunidade α' da 7S com MM a variar entre 81.81 e 84.74 kDa, subunidade α da 7S com MM entre 76.11 e 78.62 kDa e subunidade β da globulina 7S com MM entre 46.54 e 51.34 kDa. As massas estimadas para os polipéptidos ácidos e básicos da globulina 11S variaram entre 32.88 –

34.62 kDa e 20.12 – 20.96 kDa, respetivamente. A banda AB-11S apresenta MM a variar entre 51.90 e 53.41 kDa.

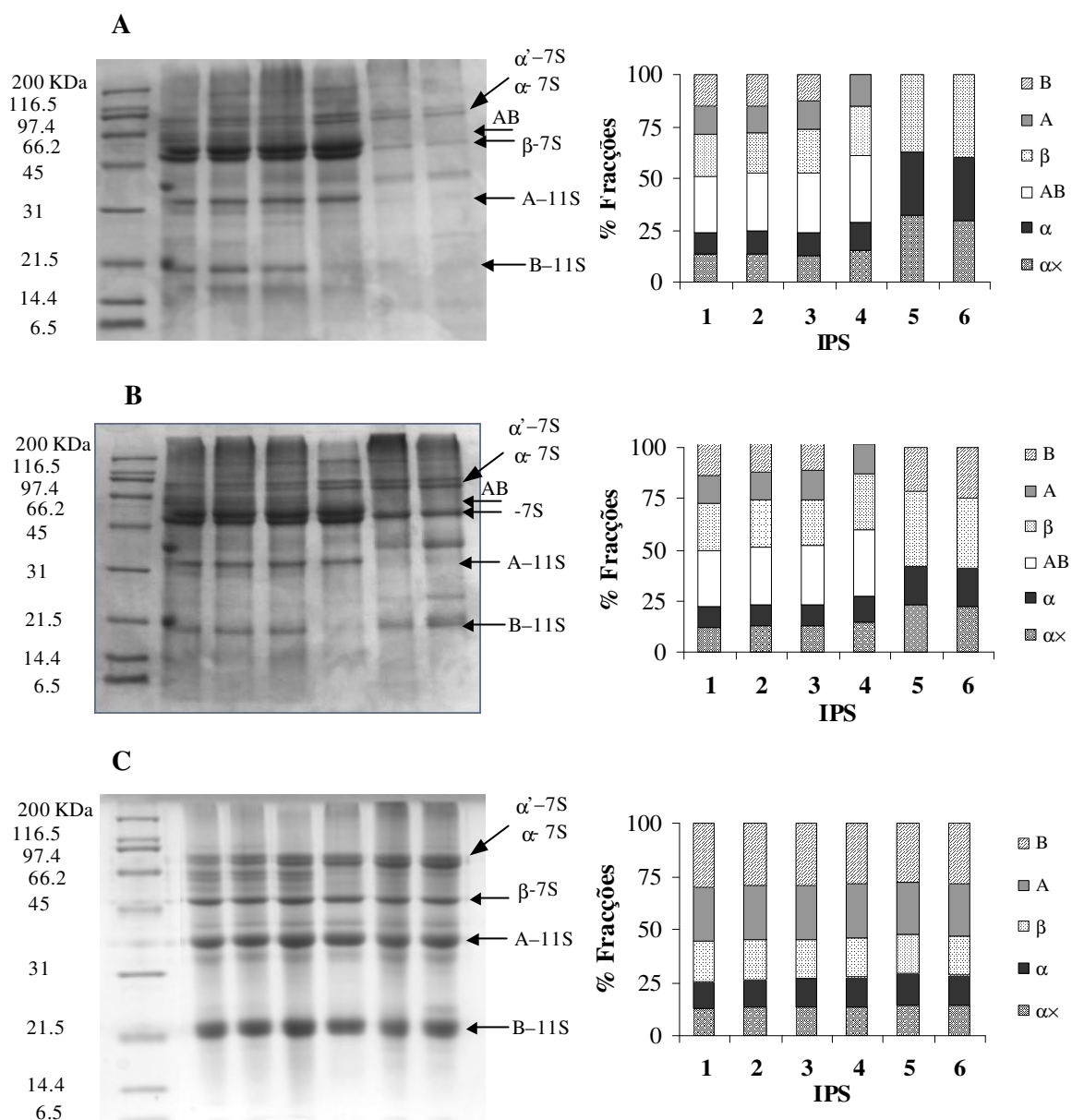


Figura 2.9 – Eletroforese SDS-PAGE não redutora das frações solúveis em água (AG) (A), tampão Tris/Gli/ureia/SDS (B) e Tris/Gli/ureia/SDS/DTT (C), dos IPS em análise (linhas 2 a 7). Coluna 1 corresponde ao padrão de massa molecular (BioRad). Gráficos à direita representam a percentagem de área, obtida por densitometria, das subunidades α' , α , β da fração 7S e dos polipéptidos ácidos e básico da fração 11S em relação à área total das frações quantificadas em cada coluna.

O perfil electroforético das proteínas solúveis em água e tampão Tris/Gli/ureia/SDS dos IPS obtidos laboratorialmente 1, 2 e 3 foi semelhante, detetando-se todas as bandas referidas anteriormente. Contudo, no IPS laboratorial 4 não se observou, na fração solúvel

em água e tampão Tris/Gli/ureia/SDS, a banda correspondente ao polipéptido B da globulina 11S ao passo que para os IPS comerciais não se identificaram as bandas AB e o polipéptido A-11S mas no solvente Tris/Gli/ureia/SDS já se conseguiu identificar o polipéptido B-11S sugerindo que estas frações são insolúveis nestes solventes, possivelmente porque estão envolvidas na formação de agregados estabilizados quer por pontes dissulfureto quer por interações eletrostáticas. Para além disso, no solvente Tris/Gli/ureia/SDS, o aumento do conteúdo da fração β -7S e do polipéptido B-11S dos isolados comerciais (Figura 2.10-B) sugere que o tratamento sofrido por estes isolados promoveu a formação de agregados β -7S/11-S insolúveis em água, através de interações hidrofóbicas que foram rompidas por ação da ureia/SDS. Analisando os gráficos relativos à percentagem relativa das áreas pode-se inferir que as frações solúveis dos isolados com maior grau de agregação (IPS 4, 5 e 6) são constituídas, predominantemente, pela fração 7S sugerindo que as globulinas 11S possuem maior tendência para formar agregados.

A redução, por ação do tampão Tris/Gli/ureia/SDS/DTT, resultou na dissociação completa das subunidades AB existentes nos IPS laboratoriais aumentando, como seria de esperar, o conteúdo dos polipéptidos A e B nas frações solúveis desses isolados (Figura 2.9 e 2.10-C). Este incremento foi também observado para os isolados comerciais apesar de nestes não existir a fração AB, o que reforça mais uma vez o papel das pontes S-S na formação de agregados insolúveis nesses isolados. Por outro lado, a banda de MM superior a 100 kDa existente em todos os IPS desapareceu em Tris/Gli/ureia/SDS/DTT, sugerindo que estes agregados eram estabilizados por ligações S-S.

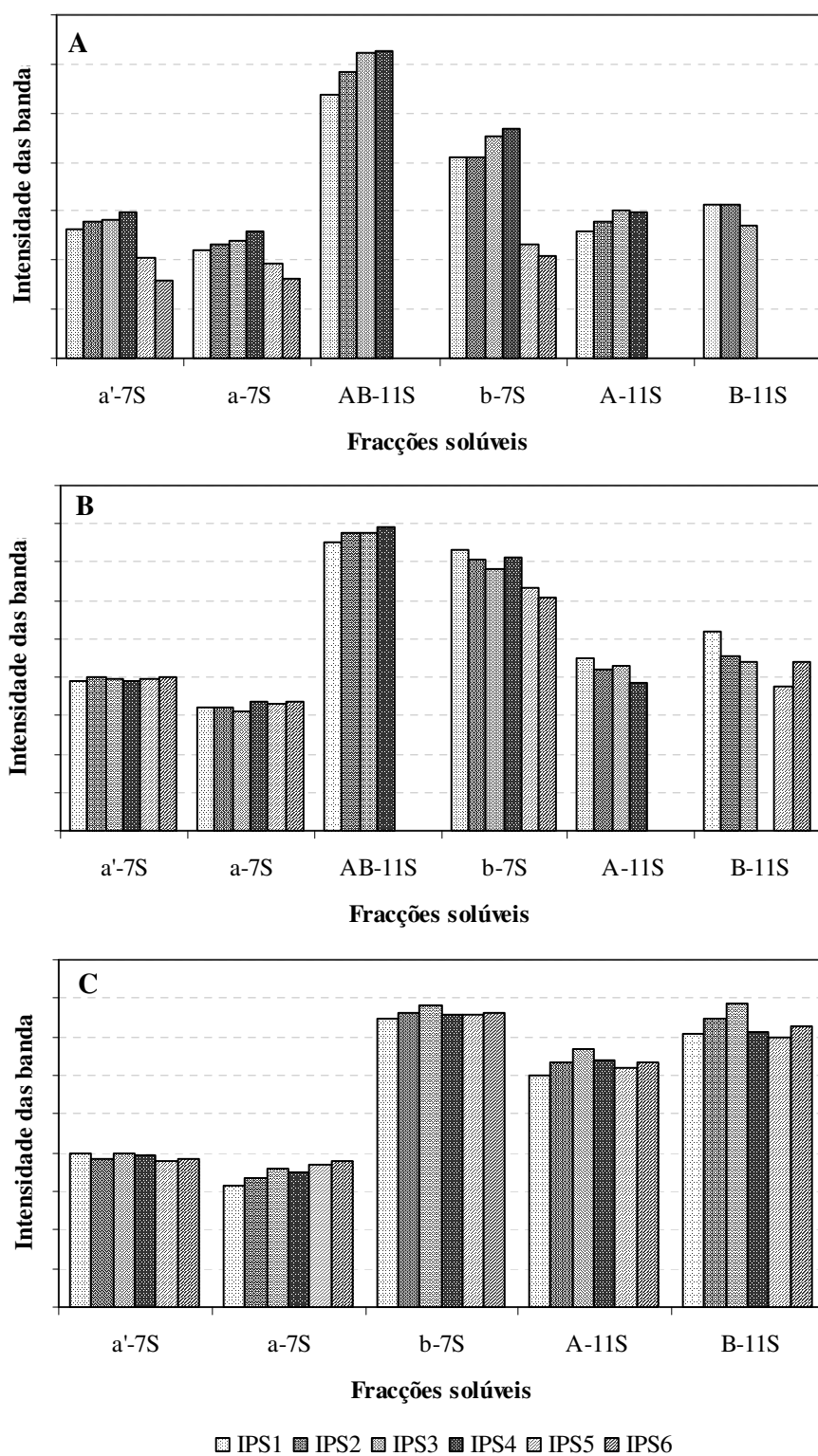


Figura 2.10 – Intensidade das bandas (ODs) existentes das frações solúveis dos diferentes isolados em diferentes solventes: água (A), tampão Tris/Gli/ureia/SDS (B) e Tris/Gli/ureia/SDS/DTT (C)

2.3.7 Análise térmica por calorimetria diferencial de varrimento

Com o objetivo de avaliar o efeito dos diferentes métodos utilizados para a obtenção dos IPS nas propriedades térmicas das proteínas de soja realizaram-se ensaios de DSC.

A Figura 2.11 apresenta, a título exemplificativo, o termograma de um IPS laboratorial (IPS 4) e de um comercial (IPS 5). Nas condições experimentais usadas foram observadas duas transições endotérmicas para os IPS 1, 2, 3 e 4 indicadas na Figura 2.11 pelas letras A e B. A primeira transição corresponde à desnaturação da fração 7S (β -conglícinina) e a segunda à desnaturação da fração 11S (glicínina). No que se refere aos isolados comerciais (IPS 5 e 6) não se observa nenhuma transição nítida sugerindo que ambas as frações proteicas se encontravam já completamente desnaturadas.

As transições endotérmicas são caracterizadas por uma temperatura de início, uma temperatura no pico da transição, a qual foi designada por temperatura de desnaturação (T_d), uma temperatura no fim e por uma variação de entalpia associada à transição (ΔH) determinada por integração das curvas de fluxo de calor.

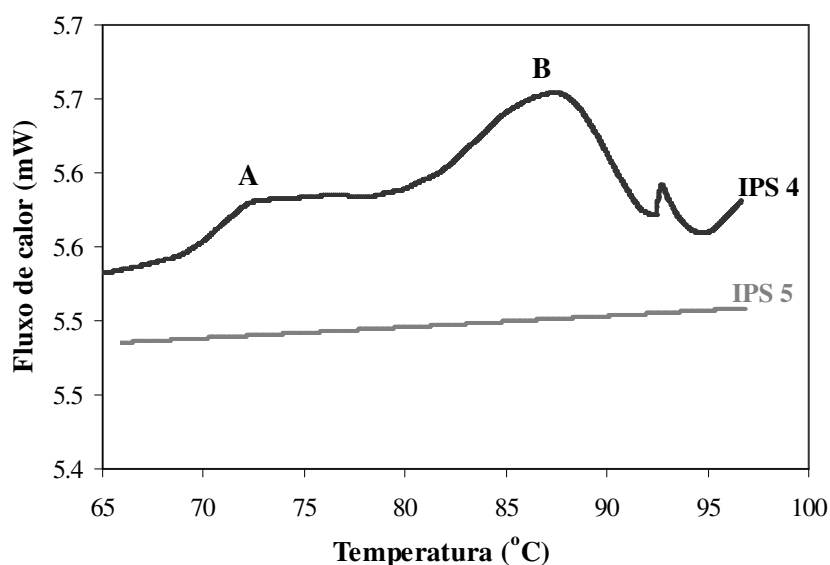


Figura 2.11- Termogramas exemplificativos do IPS 4 (linha preta) e do IPS 5 (linha cinzenta)

A Tabela 2.3 apresenta os valores médios de entalpia de desnaturação (considerando a soma das variações de entalpia associadas à desnaturação de cada fração) e as temperaturas de desnaturação (T_d) dos IPS em estudo.

Tabela 2.3 – Valores médios das temperaturas de desnaturação da β -conglucininina (T_{d1}) e da glicininina (T_{d2}) e das entalpias médias de desnaturação (ΔH) dos IPS

IPS	T_{d1} (°C)	T_{d2} (°C)	ΔH_T (J/g)
1	73.77 ± 0.50	89.52 ± 0.21	7.15 ± 0.48
2	73.56 ± 0.62	92.25 ± 0.35	6.45 ± 0.82
3	73.23 ± 0.00	90.60 ± 0.05	5.48 ± 0.07
4	75.5 ± 0.66	89.15 ± 0.18	5.00 ± 0.42
5	—	—	0
6	—	—	0

As temperaturas de desnaturação determinadas para os diferentes isolados estão de acordo com os valores obtidos por outros autores (Petrucelli e Añón, 1994; Hua *et al.*, 2005) sendo contudo, ligeiramente superiores às referidas na pesquisa de Renkema e Vliet (2002): $T_{d1}=68$ °C; $T_{d2} = 88$ °C. Estas variações poderão estar relacionadas com vários fatores, nomeadamente com as diferentes taxas de aquecimento utilizadas. O termograma do IPS 1 apresentou dois picos correspondentes às globulinas 7S e 11S, o valor de entalpia de transição calculado foi de 7.15 J/g de proteína. Reportando à literatura pode-se referir que este isolado, embora não tenha sido submetido a tratamentos térmicos, pode já ter sofrido alguma desnaturação uma vez que o valor de ΔH determinado é significativamente inferior ao determinado por Sorgentini *et al.* (1995) e por Puppo *et al.* (2000) para isolados nativos (17.6 e 16.4 J/g de proteína, respetivamente) mas superior aos valores reportados para isolados comerciais desnaturados (Hua *et al.*, 2003; Hua *et al.*, 2005). Saliente-se a discrepância de valores de entalpia de desnaturação dos IPS laboratoriais encontrados na literatura (Arrese *et al.*, 1991; Petrucelli e Añón, 1995; Puppo *et al.*, 2000; Hua *et al.*, 2005). Os IPS 2, 3 e 4, obtidos a partir de matérias-primas submetidas a tratamentos industriais a 60, 80 e 100 °C respetivamente, também apresentaram os dois picos correspondentes à desnaturação das duas principais globulinas da soja porém com menores valores de ΔH . O IPS 4, cuja matéria-prima foi tratada a 100 °C, foi o isolado laboratorial com menor valor de ΔH embora apresente valores de T_{d1} ligeiramente maiores do que os restantes IPS laboratoriais.

Avaliando o grau de desnaturação das amostras dos IPS, dado pela relação percentual entre o valor de ΔH do IPS 1 e cada um dos restantes isolados, são obtidos os seguintes valores

de diminuição da entalpia de desnaturação: 9.79 % para o IPS 2, 23.36 % para o IPS 3, 43.64 % para o IPS 4 e 100 % para os dois IPS comerciais (IPS 5 e 6). Assim, pode-se concluir que a percentagem da fração proteica desnaturada variou em função do processamento das matérias-primas e, de acordo com os resultados anteriormente discutidos, pode ter sofrido agregação estando menos disponível para integrar uma rede gel.

2.3.8 Caracterização reológica dos IPS

Com esta parte do trabalho pretendeu-se avaliar as propriedades gelificantes de cada um dos IPS e tentar relacioná-las com as propriedades físico-químicas até agora analisadas. Utilizaram-se ensaios reológicos em regime oscilatório a baixa amplitude de deformação, quer acompanhando a evolução dos módulos viscoelásticos com a variação da temperatura (40-95-20 °C) (§ 2.3.8.2), quer através de ensaios a temperatura constante (§2.3.8.3), caracterizando-se o sistema final obtido, em ambos os casos, através de espectros mecânicos (varrimentos em frequência a temperatura constante).

2.3.8.1 Identificação da zona de comportamento viscoelástico linear

A caracterização reológica dos IPS iniciou-se pelo estudo da sensibilidade à tensão sinusoidal imposta e pela definição da zona de comportamento viscoelástico linear, na qual se assume que a deformação imposta ao sistema não influencia o seu comportamento. A definição da zona de comportamento viscoelástico linear foi efetuada com base em ensaios de varrimento de tensão sinusoidal aplicada, testando-se a sensibilidade da resposta à deformação resultante. A Figura 2.12 apresenta exemplos de curvas de varrimento de tensão sinusoidal aplicada a géis do IPS 4 e do IPS 5 obtidos de acordo com o procedimento descrito em 2.3.8.2. A zona de linearidade do IPS 4 é ligeiramente maior do que a do IPS 5, observando-se um ligeiro aumento de G' com a deformação antes do seu decréscimo. O limite máximo de linearidade foi aproximadamente de 1 %, valor este definido como deformação para a realização dos ensaios reológicos com todos os isolados.

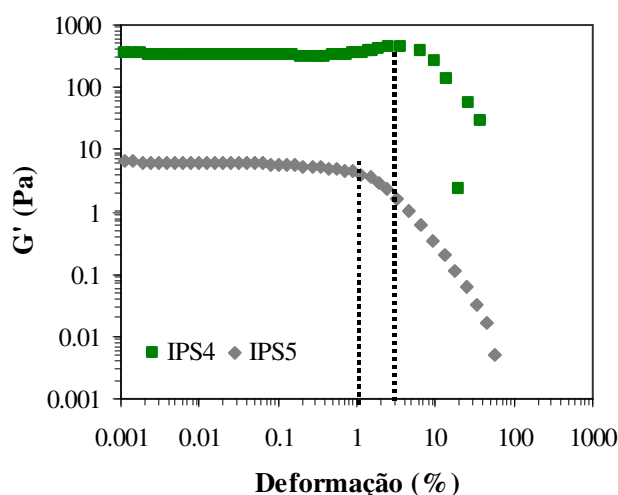


Figura 2.12-Módulo de armazenamento em função da deformação para IPS 4 e IPS 5 a 11 %, pH 7, a 20 °C e frequência de oscilação de 5 rad/s.

2.3.8.2 Ensaios não – isotérmicos

As amostras foram submetidas a um incremento controlado da temperatura de 40 a 95 °C (1 °C/min). Esta temperatura foi mantida durante 10 min e depois diminuída, à mesma taxa, até 20 °C. Os módulos de armazenamento (G') e de perda (G'') foram registados ao longo de toda a experiência (Figura 2.13), que se realizou a uma frequência de oscilação constante de 5 rad/s e uma deformação de 1 %.

Analisando a Figura 2.13 é possível constatar que no início dos ensaios G'' é superior a G' em todos os sistemas em estudo embora os módulos viscoelásticos dos isolados 1, 2 e 3 sejam muito irregulares e próximos do ruído do equipamento. Por outro lado, os isolados 4, 5 e 6 apresentam valores dos módulos viscoelásticos bem definidos e superiores aos registados para os restantes isolados, sendo esta diferença mais significativa para os isolados comerciais, IPS 5 e 6. Estas observações poderão relacionar-se com o grau de pré-agregação que conduzirá a uma maior estruturação do sistema e consequentemente módulos viscoelásticos superiores. O progressivo aumento da temperatura da experiência causa a dissociação das globulinas 7S e 11S constituintes da soja as quais, subsequentemente, interagem entre si resultando no aumento progressivo de G' e G'' .

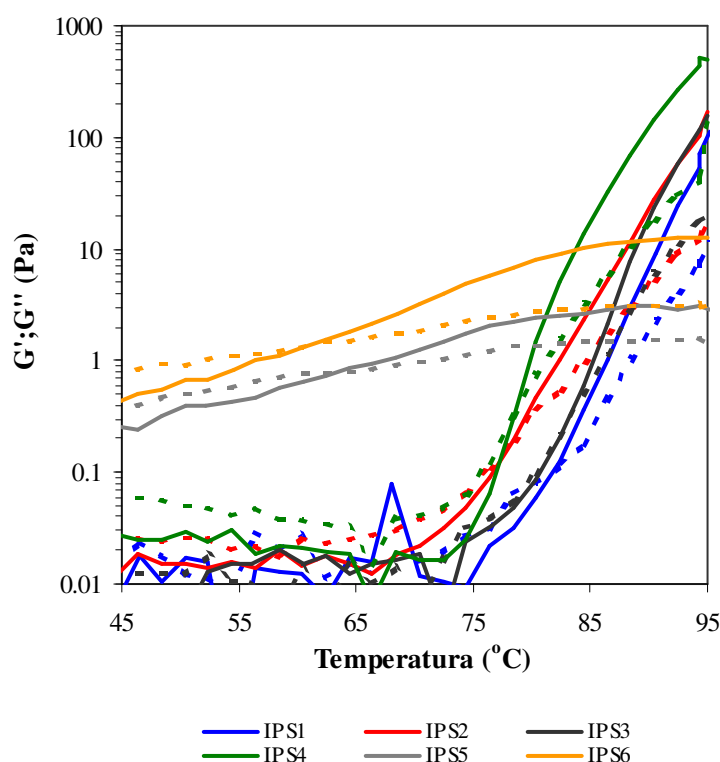


Figura 2.13 – Evolução dos módulos viscoelásticos, G' (linha a cheio) e G'' (linha aberta) de IPS a 11 % durante o aquecimento, 45-95 °C, a uma taxa de 1 °C/min, 5 rad/s.

A temperatura de gelificação (T_{gel}), definida como a temperatura a que G' iguala G'' , dos isolados comerciais é bastante inferior (a variar entre 60.4 e 64.4 °C) à dos isolados obtidos laboratorialmente (a variar entre 80.4 e 84.4 °C), o que possivelmente resultará do maior grau de desnaturação das proteínas no primeiro grupo de isolados. Assim, estando já as cadeias polipeptídicas, nestes isolados, desenroladas, o aumento da temperatura mais rapidamente promove a interação entre os grupos reativos das cadeias e consequentemente mais rápido e a menores temperaturas se atinge o ponto de gelificação. As T_{gel} dos isolados comerciais são bastante inferiores à T_d da β -conglícinina o que corrobora com a existência de uma total desnaturação prévia desta fração (Tabela 2.3) ao passo que a T_{gel} dos isolados laboratoriais é superior à T_d da β -conglícinina, sendo necessário, neste caso, atingir uma temperatura suficiente para que ocorra desnaturação em extensão suficiente para posterior reorganização proteica, agregação e formação do gel.

Relativamente aos isolados laboratoriais, a diferença na T_{gel} em função da origem do material de extração do isolado não é bem evidente, podendo relacionar-se com a pequena diferença no grau de desnaturação entre estes isolados (Tabela 2.3). Contudo, o IPS 4

apresenta uma T_{gel} ligeiramente inferior à dos restantes IPS laboratoriais e o IPS 1 a maior T_{gel} .

No que se refere à taxa de evolução dos módulos viscoelásticos após o ponto de gelificação, observou-se que esta foi bastante maior para os isolados laboratoriais do que para os comerciais atingindo, a 95 °C, valores superiores em cerca de uma década. Estas observações mostram que o fortalecimento da rede tridimensional é bastante mais acentuado nos isolados laboratoriais possivelmente devido à maior incorporação de moléculas proteicas na rede, as quais, no caso dos isolados comerciais, estão na forma de agregados insolúveis termodinamicamente mais estáveis (Tang *et al.*, 2009) e, por isso, são menos desdobradas e dissociadas pelo tratamento térmico, ficando menos disponíveis para integrarem a rede tridimensional.

Entre os isolados estudados, o IPS 4 foi o que atingiu valores de módulos viscoelásticos mais elevados denotando maior capacidade gelificante. Inicialmente poderia parecer contraditório este resultado já que, entre os isolados laboratoriais, o IPS 4 foi o que apresentou maior agregação inicial. Contudo, os resultados obtidos poderão estar relacionados com a natureza das interações responsáveis pela formação dos agregados. Observando a Figura 2.3 e 2.4 verifica-se que o principal tipo de interação nos agregados dos isolados comerciais é diferente do isolado 4: para os primeiros predominam as pontes dissulfureto, ligações covalentes fortes enquanto, nos segundos são as interações hidrofóbicas, comparativamente mais fracas. Assim, as ligações entre as moléculas agregadas nos IPS 5 e 6 são menos termolábeis e, consequentemente, essas moléculas são menos suscetíveis de sofrerem os processos necessários para que ocorra a gelificação.

Arrese *et al.* (1991) e, mais recentemente, Hua *et al.* (2005) relacionaram a maior capacidade gelificante dos isolados com a maior desnaturação das proteínas e com a quantidade da subunidade β -7S e do polipéptido B-11S na fração solúvel dos isolados. Com efeito, revendo os perfis electroforéticos das frações solúveis dos isolados em estudo (Figura 2.9) observa-se que os isolados comerciais apresentaram menor quantidade das frações em questão. Por outro lado, o IPS 4 é o que apresenta maior conteúdo em subunidade β -7S embora a sua fração solúvel seja pobre no polipéptido B (Figura 2.9 A). Os perfis electroforéticos apresentados na Figura 2.9 A e C sugerem que grande parte do polipéptido B do IPS 4 deverá estar envolvido na formação dos agregados AB.

Para os sistemas em análise, o arrefecimento do sistema de 95 ° a 20 °C foi acompanhado do aumento monótono de G' e G'' (Figura 2.14) traduzindo o fortalecimento das interações não covalentes, em grande medida, pontes de hidrogénio, entre as moléculas e agregados que constituem o gel, resultando no aumento considerável da rigidez do gel. Resultados similares são descritos na literatura para proteínas de soja e evidenciam a importância das ligações de hidrogénio na estrutura do gel (Renkema e van Vliet, 2002). Todavia, a taxa de crescimento dos módulos viscoelásticos é menor para os IPS comerciais.

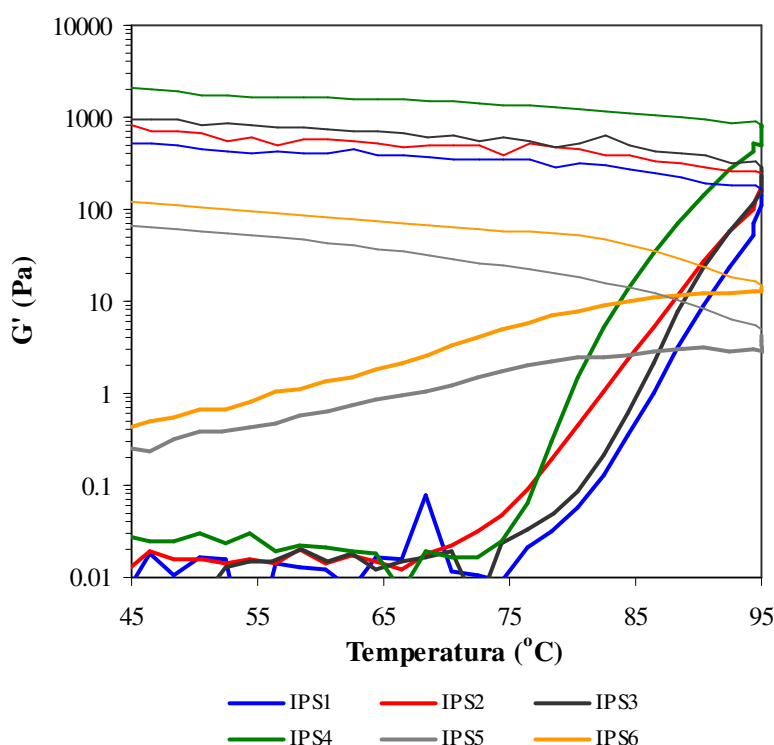
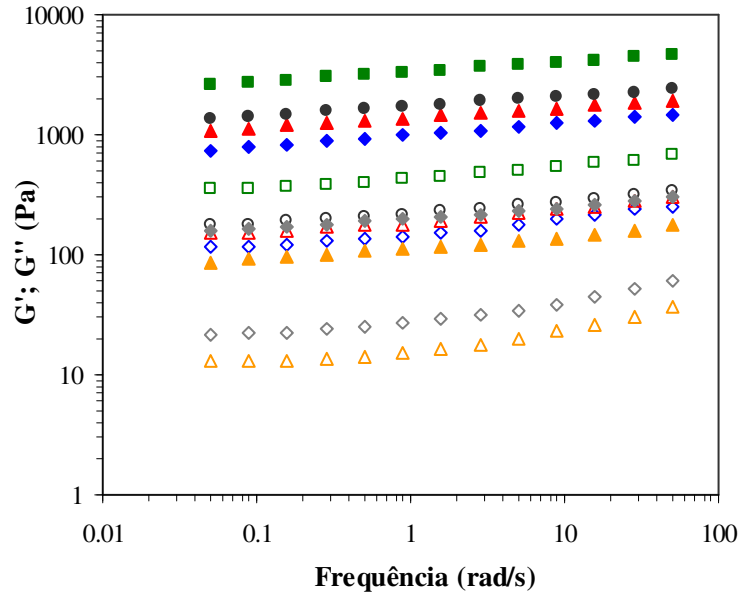


Figura 2.14 – Variação do módulo de armazenamento (G') dos diferentes isolados durante o aquecimento 40-95 °C (linhas grossas) e arrefecimento 95-20 °C (linhas finas)

Após o arrefecimento a 20 °C, o efeito da origem da matéria-prima nas propriedades viscoelásticas foi analisado por observação dos ensaios oscilatórios de varrimento em frequência (Figura 2.15). Todos os IPS estudados apresentaram valores de módulo de armazenamento mais elevados do que os valores do módulo de perda mostrando um comportamento predominantemente elástico, tal como se comprovou pelos valores de tangente de perda ($\tan \delta = G''(t)/G'(t)$) sempre inferiores à unidade na gama de frequências analisada. Contudo, notam-se diferenças na rigidez do gel final obtido, constatando-se que o gel do IPS 4 é o mais rígido e, pelo contrário, o do IPS 6 é o menos rígido. Para além

disso, os géis dos isolados comerciais apresentaram maior dependência de G' com a frequência de oscilação (declive médio $\cong 0.094$) do que os isolados laboratoriais (declive $\cong 0.083$) denotando uma mobilidade molecular (rearranjos) ligeiramente superior.



(♦,♦) IPS 1; (▲,▲) IPS 2; (●,○) IPS 3; (■,□) IPS 4; (◆,◇) IPS 5; (▲,△) IPS 6.

Figura 2.15– Espectros mecânicos para os IPS 11 % a pH 7, obtidos a 20 °C após as experiências não isotérmicas (G' símbolos a cheio; G'' símbolos abertos).

2.3.8.3 Ensaios isotérmicos

O passo seguinte foi investigar a evolução temporal das propriedades viscoelásticas das dispersões dos diferentes IPS a 80 °C. A Figura 2.16 apresenta a evolução ao longo de 3 h do módulo de armazenamento e da tangente ao ângulo de perda de dispersões a 11 % dos IPS a pH 7. Após as 3 h de maturação do gel a 80 °C realizou-se um espectro mecânico à mesma temperatura (Figura 2.18).

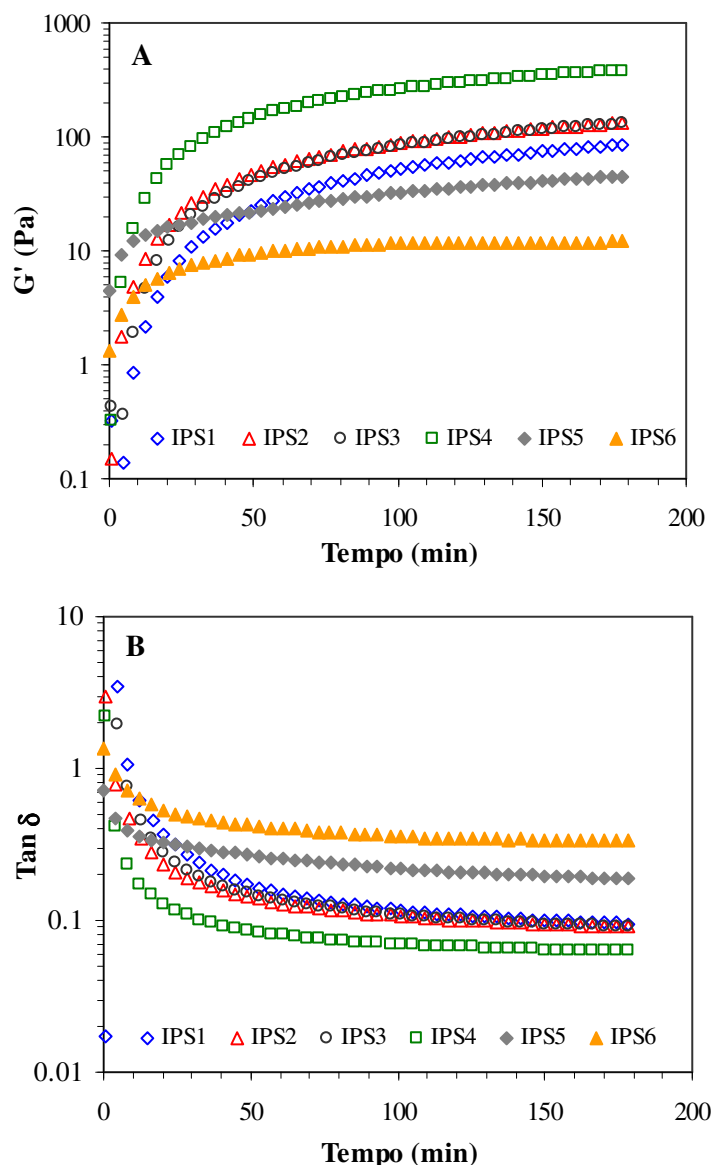


Figura 2.16 – Variação do módulo de armazenamento, G' , (A) e respetiva variação da tangente ao ângulo de perda, $\tan \delta$, (B) durante as experiências de cura a 80 °C para os IPS a 11 %

De um modo geral, as curvas de maturação dos géis apresentadas na Figura 2.16-A seguiram o comportamento geralmente observado para a gelificação de biopolímeros, incluindo proteínas globulares (Tobitani e Ross-Murphy, 1997; Kavanagh *et al.*, 2000; Ikeda, 2003): Após uma fase inicial de elevada taxa de estruturação do gel, com rápido aumento de G' , segue-se uma zona de variação menos acentuada. Assim, após formação do gel, a rede macromolecular é progressivamente reforçada por incorporação de uma maior quantidade de moléculas na fase gel, aumentando as propriedades elásticas do sistema.

A análise dos perfis de maturação dos géis dos diferentes IPS (Figura 2.16 A) em estudo permitiu constatar que o G' inicial dos IPS comerciais foi superior ao dos isolados laboratoriais e, durante os primeiros minutos de aquecimento a 80 °C, G'' foi ligeiramente superior a G' para todos os isolados laboratoriais, revelando a natureza líquida das dispersões destes isolados. Contudo, a relação dos módulos viscoelásticos dos isolados comerciais foi oposta: desde logo G' assumiu valores superiores aos de G'' demonstrando assim maior pré-agregação das moléculas proteicas nestes isolados. Para os isolados obtidos laboratorialmente, o cruzamento dos módulos aconteceu nos primeiros minutos da experiência, sendo definido como o tempo de gelificação (t_{gel}) à temperatura de 80 °C. Pequenas variações no tempo de gelificação foram observadas em função da matéria-prima de extração dos isolados, no entanto, verificou-se que quanto maior o grau de pré-agregação menor o tempo de gelificação. Assim, o t_{gel} do IPS 1 foi, aproximadamente, 10 min enquanto que o do IPS 4 foi de apenas 2.5 min. Os t_{gel} dos restantes isolados laboratoriais foram intermédios (Figura 2.17).

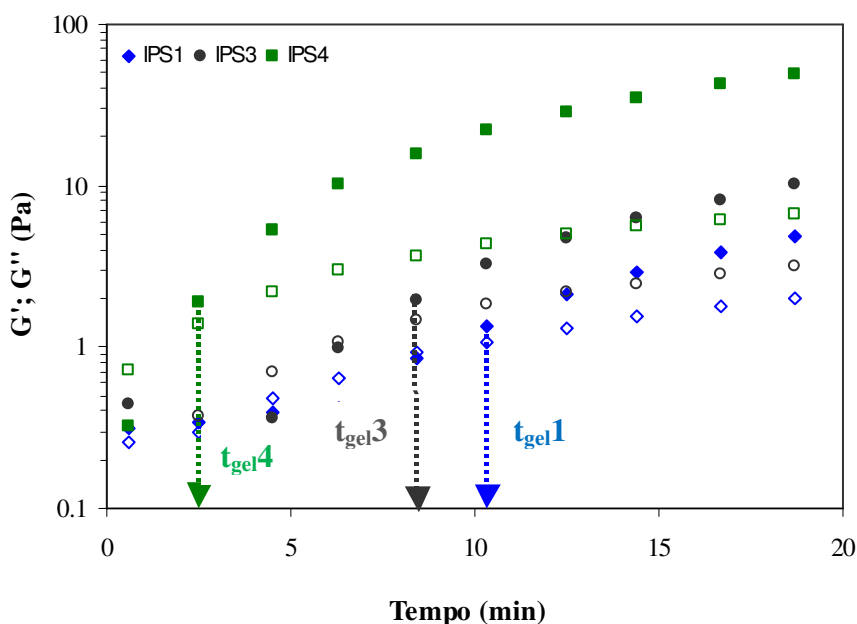


Figura 2.17 – Variação de G' (símbolos fechados) e G'' (símbolos abertos) nos primeiros 30 min dos ensaios isotérmicos a 80 °C e respetivos tempos de gelificação, t_{gel} , dos IPS 1, 3 e 4

Após o estabelecimento da ténue rede tridimensional, no momento de gelificação, as moléculas até aí presentes na fase *sol* vão-se agregando, reforçando a rede, o que faz aumentar progressivamente a sua elasticidade (processo de cura). Nesse período, numa

primeira fase, ocorre um aumento acentuado de G' , correspondendo a uma elevada taxa de estruturação do gel. A taxa de aumento de G' tende a diminuir ao longo da maturação correspondendo a uma reorganização da rede molecular, envolvendo uma variação ligeira, mas contínua, do número e/ou extensão das zonas de junção, atingindo-se uma zona de pseudo-equilíbrio. Os resultados obtidos na Figura 2.16 A permitem verificar que a fase inicial de maturação do gel é mais prolongada nos IPS laboratoriais do que nos comerciais, revelando que a gelificação dos isolados comerciais é mais rápida, provavelmente porque as suas proteínas têm maior grau de desnaturação, como se pode observar nos resultados apresentados na Tabela 2.3. Contudo, esta rapidez de gelificação não se traduziu em géis mais rígidos e elásticos, tal como se comprova pelos valores das $\tan \delta$ (Figura 2.16 B): os isolados 5 e 6 apresentam $\tan \delta$ maiores do que qualquer um dos isolados obtidos laboratorialmente denotando o maior carácter viscoso desses sistemas. Por outro lado, o perfil de maturação dos géis destes isolados comerciais foi o que apresentou menor evolução ao longo das 3 h de experiência denotando uma menor reorganização e estruturação molecular.

Pode-se assim inferir que os géis obtidos dos isolados comerciais em estudo são menos elásticos e estruturados (menor carácter “sólido”) possivelmente como resultado da acentuada pré-agregação proveniente da total desnaturação das proteínas nestes isolados como se observou pelos resultados de DSC (Tabela 2.3). Por outro lado, as interações estabelecidas na formação destes pré-agregados são fortes e termodinamicamente estáveis não ocorrendo, a 80 °C, a reorganização e estruturação necessária para a formação de uma rede tridimensional mais forte e elástica. O IPS 4 originou o gel mais rígido e elástico à semelhança do que se verificou na gelificação não isotérmica, não se registando diferenças significativas de elasticidade entre os isolados 2 e 3. Contudo, ao longo das 3 h de ensaio de maturação, o valor de G' do IPS 1 foi inferior ao dos restantes isolados laboratoriais. Estes resultados poderão relacionar-se com o grau de desnaturação das proteínas constituintes de cada isolado induzindo, com o processamento das matérias-primas, à ocorrência de agregação das moléculas proteicas previamente ao processo de gelificação. O comportamento viscoelástico dos géis dos diferentes IPS obtidos após 3 h a 80 °C foi analisado através dos espectros mecânicos, apresentados na Figura 2.18.

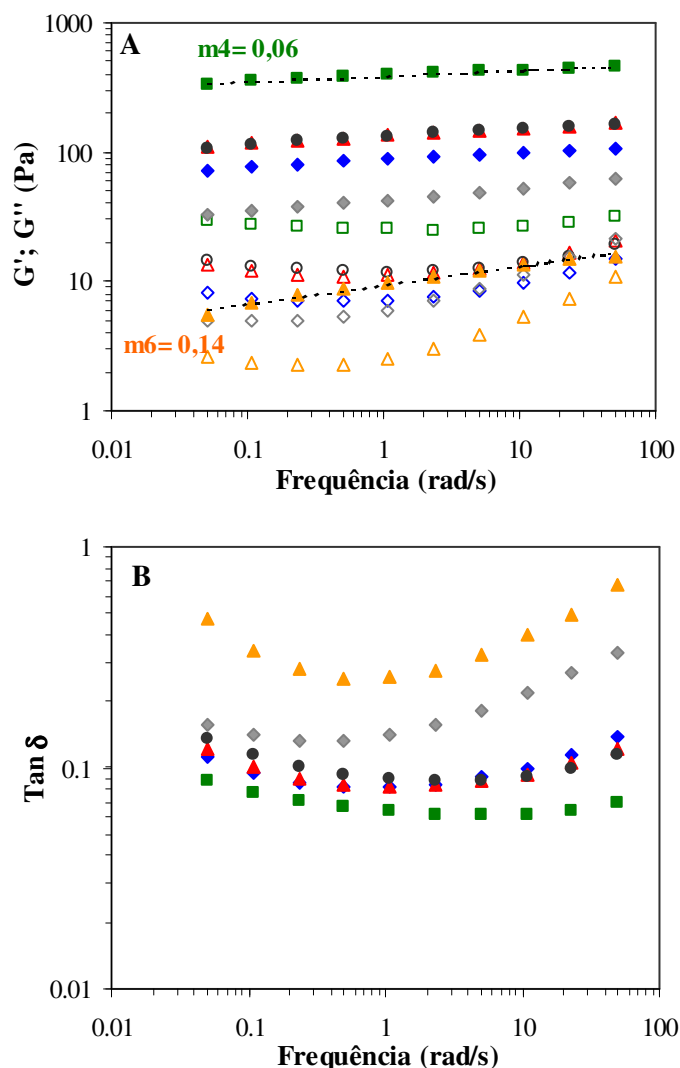


Figura 2.18 – Espectros mecânicos (A) a 80 °C e respectiva variação da tangente ao ângulo de perda (B) obtidos após as experiências de cura dos IPS, a 11 %, pH 7 de: IPS 1 (◆,◇); IPS 2 (▲,△); IPS 3 (●,○); IPS 4 (■,□); IPS 5 (◆,◇) e IPS 6 (▲,△).

Quando analisamos os varrimentos em frequência constata-se que o caráter elástico de todos os isolados analisados foi sempre superior ao caráter viscoso, como se pode verificar pelos valores de $\tan \delta$ sempre inferiores à unidade. Como já anteriormente verificado, os módulos viscoelásticos dos géis dos isolados comerciais apresentaram maior dependência face à variação da frequência de oscilação, com o declive a variar entre 0.093 e 0.140 para o IPS 5 e 6, respetivamente, exibindo, por isso, um comportamento típico de géis que não estão perfeitamente estabelecidos, onde os rearranjos moleculares ocorrem em maior extensão. Além disso, o maior valor da $\tan \delta$ destes isolados, para baixas frequências de oscilação, mostram que estes géis apresentam um comportamento viscoso acentuado,

sendo o “tempo médio de vida” das ligações proteína-proteína relativamente pequeno. Os módulos viscoelásticos dos isolados obtidos laboratorialmente, são superiores aos registrados para os isolados comerciais e a sua dependência da frequência foi menos pronunciada tal como se comprovou pelos valores de declive a variarem entre 0.055 e 0.061. Entre os isolados laboratoriais, o IPS 4 foi o que apresentou módulos viscoelásticos superiores e uma menor dependência face à frequência de oscilação, correspondendo a um gel mais rígido e estruturado, à semelhança do que se verificou nos varrimentos em temperatura. Os IPS 2 e 3 apresentaram comportamento semelhante entre si e valores de módulos viscoelásticos ligeiramente superiores aos do IPS 1 sublinhando mais uma vez o efeito do grau de desnaturação e consequente grau de pré-agregação das globulinas constituintes dos isolados.

2.3.9 Considerações finais

Os resultados obtidos permitiram concluir que a matéria-prima a partir da qual se extraiu o isolado de proteína de soja influenciou as propriedades físico-químicas estudadas dos isolados obtidos, refletindo-se nas propriedades gelificantes dessas proteínas. O tipo de interação maioritariamente responsável pelos agregados diferiu nos isolados comerciais e laboratoriais sendo a constituição proteica da fração solúvel dos diferentes isolados distinta.

Foi possível relacionar o grau de desnaturação das globulinas constituintes dos isolados com a severidade do processamento da matéria-prima refletindo-se no grau de pré-agregação desses isolados, o que foi determinante para as propriedades viscoelásticas das dispersões, resultando numa diminuição da temperatura e tempo de gelificação bem como na diminuição da rigidez e elasticidade dos géis finais obtidos com o aumento do grau de desnaturação e pré-agregação. As dispersões dos isolados comerciais formaram géis com maior carácter viscoso enquanto que as dos isolados laboratoriais originaram géis ligeiramente mais elásticos. A diferença significativa entre a rigidez final dos géis comerciais e laboratoriais pode ser explicada com base na ocorrência de processos distintos após o ponto de gelificação: nos isolados laboratoriais, o aumento de G' e G'' poderá resultar de rearranjos tridimensionais por fusão dos agregados proteicos permitindo assim o aumento das interações proteína-proteína e consequentemente o aumento da rigidez do

gel enquanto que nos isolados comerciais as moléculas proteicas encontram-se sob a forma de macro-agregados insolúveis em água, termodinamicamente estáveis sendo menos desdobradas e dissociadas pelo tratamento térmico, ficando menos disponíveis para integrarem a rede tridimensional.

Assim, com base nestes resultados seleccionaram-se os isolados 4 e 5 para a realização dos estudos descritos nos capítulos 3, 4 e 5. Devido à menor solubilidade dos isolados comerciais foi necessário optar por um isolado laboratorial para estudar o efeito da adição de galactomananas na gelificação do IPS (capítulo 3). De entre os isolados laboratoriais, a escolha do IPS 4 prendeu-se com o facto deste ser um desperdício da indústria alimentar e, por isso, mais vantajoso tentar rentabilizá-lo. Para os capítulos 4 e 5, onde se estudou, respetivamente, o efeito da hidrólise enzimática parcial e da alta pressão nas propriedades funcionais de isolados de proteína de soja, optou-se por escolher um isolado comercial de forma a tentar melhorar as suas propriedades funcionais para alargar as suas possíveis aplicações. Foi selecionado o IPS 5 uma vez que foi o isolado comercial que apresentou maior capacidade gelificante.

Referências Bibliográficas

- Alvarez, P.A., Ramaswamy, H.S. e Ismail, A.A. (2008). High pressure gelation of soy proteins: Effect of concentration, pH and additives. *Journal of Food Engineering*, 88: 331-340.
- Arrese, E.L., Sargentini, D.A, Wagnerr, J.R. e Añón, M.C. (1991). Electrophoretic, solubility, and functional Properties of commercial soy protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39: 1029-1032.
- Bainy, E.M., Tosh, S. Corredig, M., Woodrow, L. e Poysa, V. (2008). Protein subunit composition effects on the thermal denaturation at different stages during the soy protein isolate processing and gelation profiles of soy protein isolates. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85: 581-590.
- Bainy, E.M., Corredig, M., Poysa, V., Woodrow, L. e Tosh, S. (2010). Assessment of the effects of soy protein isolates with different protein compositions on gluten thermosetting gelation. *Food Research International*, 43: 1684-1691.
- Barros, A. (1999). Contribution à la sélection et la comparasion de variables caractéristiques, *PhD. Thesis, Institut Nationale Recherche Agronomique*: Paris, France.
- Boatright, W.L. e Hettiarachchy, N.S. (1995). Effect of lipids on soy protein isolates solubility. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 72: 1439-1444.
- Britten, M. e Giroux, H.J. (2001). Acid-induced gelation of whey protein polymers: effect of pH and calcium concentration during polymerization. *Food Hydrocolloids*, 15: 609-617.
- Durand, D.D., Gimel, J.C. e Nicolai, T. (2002). Agregation, gelation and phase separation of heat denatured globular proteins. *Physica A*, 304: 253-265.
- Food and Nutrition Board – National Research Council (1981) *Food Chemicals Codex*, National Academy Press, Washington, DC.
- García, M.C., Marina, M.L., Laborda, F. e Torre, M. (1998). Chemical characterization of commercial soybean products. *Food Chemistry*, 62: 325-331.
- García, M.C., Torre, M., Marina, M.L. e Laborda, F. (1997). Composition and characterization of soybean and related products. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37: 361-391.
- German, B., Damodaran, S. e Kinsella, J.E. (1982). Thermal dissociation and association behavior of soy proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30: 807-811.
- Henn, R.L. e Netto, F.M. (1998). Biochemical characterization and enzymatic hydrolysis of different commercial soybean protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 3009-3015.
- Hermansson, A.M. (1986). Soy protein gelation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 63: 658-666.
- Hua, Y., Cui, S.W. e Wang, Q. (2003). Gelling property of soy protein-gum mixtures. *Food*

Hydrocolloids, 17: 889-894.

Hua, Y., Cui, S.W., Wang, Q., Mine, Y. e Poysa, V. (2005). Heat induced gelling properties of soy protein isolates prepared from different defatted soybean flours. *Food Research International*, 38: 377-385.

Ikeda, S. (2003). Heat-induced gelation of whey proteins observed by rheology, atomic force microscopy, and Raman scattering spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, 17: 399-406.

Iwabuchi, S. e Shibasaki, K. (1981). Immunochemical studies of the effects of ionic strength on thermal denaturation of soybean 7S globulin. *Agriculture Biological Chemistry*, 45: 1365-1371.

Karki, B., Lamsal, B.P., Grewell, D., Pometto, A.L., Leeuwen, J., Khanal, S.K. e Jung, S. (2009). Functional properties of Soy Protein Isolates Produced from Ultrasonicated Defatted Soy Flakes. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86: 1021-1028.

Kavanagh, G.M., Clark, A.H. e Ross-Murphy, S.B. (2000). Heat-induced gelation of globular proteins: 4. Gelation kinetics of low pH β -lactoglobulin gels. *Langmuir*, 16: 9584-9594.

Kumar, V., Rani, A., Pandey, V. e Chauhan, G.S. (2006). Changes in lipoxygenase isozymes and trypsin inhibitor activity in soybean during germination at different temperatures. *Food Chemistry*, 99: 563-568.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

Lakemond, C.M.M., Jongh, H.H.J., Gruppen, H. e Voragen, A.G.J. (2002). Differences in Denaturation of Genetic Variants of Soy Glycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 4275-4281.

Lefèvre, T. e Subirade, M. (2001). Molecular structure and interaction of biopolymers as viewed by fourier transform infrared spectroscopy: model studies on β -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*, 15: 365-376.

Liu, K. (1997). *Soybeans: Chemistry, Technology and utilization* (p.532). Chapman and Hall, New York.

López de Ogara, M.C.L., Layño, M.D., Pilosof, A.M. e Macchi, R.A. (1992). Functional properties of soy isolates as affected by heat treatment during isoelectric precipitation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 69: 184-187.

Lusas, E.W. e Rhee, K.C. (1995). Soy proteins processing and utilization. Em Eickson, D.R. (Ed.) *Practical Handbook of Soybean Processing and Utilization* (p.117-160). American oil Chemists's Society, St. Louis.

Molina, E., Papadopoulou, A. e Ledward, D.A. (2001). Emulsifying properties of high pressure treated soy protein isolate and 7S and 11S globulins. *Food Hydrocolloids*, 15: 263-269.

Nik, A.M., Tosh, S.M., Woodrow, L., Poysa, V. e Corredig, M. (2009). Effect of soy protein subunit composition and processing conditions on stability and particle size distribution of soymilk. *LWT-Food Science and Technology*, 42: 1245-1252.

- Petrucelli, S. e Añón, M.C. (1994). Relationship between the method of obtention and the structural and functional properties of soy protein isolates. 1. Structural and hydration properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42: 2161-2169.
- Petrucelli, S. e Añón, M.C. (1995). Thermal aggregation of soy protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 3035-3041.
- Poysa, V. e Woodrow, L. (2002). Stability of soybean seed composition and its effect on soymilk and tofu yield and quality. *Food Research International*, 35: 337-345.
- Poysa, V., Woodrow, L. e Yu, K. (2006). Effect of soy protein subunit composition on tofu quality. *Food Research International*, 39: 309-317.
- Puppo, M.C., Sorgentini, D.A. e Añón, M.C. (2000). Rheological Study of Dispersions Prepared with modified Soybean Protein Isolates. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77: 63-71.
- Renkema, J.M.S. e Vliet, T. (2002). Heat-induced gel formation by soy proteins at neutral pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 1569-1573.
- Shimada, K. e Cheftel, J.C. (1988). Determination of sulfhydryl groups and disulfide bonds in heat-induced gels of soy protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36: 147-153.
- Sorgentini, D.A., Wagner, J.R. e Añón, M.C. (1995). Effects of Thermal Treatment of Soy Protein Isolate on the Characteristics and Structure-Function Relationship of Soluble and Insoluble Fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 2471-2479.
- Sorgentini, D.A., Wagner, J.R., Arrese, E.L. e Añón, M.C. (1991). Water Imbibing Capacity of Soy Protein Isolates: Influence of Protein Denaturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39: 1386-1391.
- Tang, C-H. e Ma, C-Y. (2009). Effect of high pressure treatment on aggregation and structural properties of soy protein isolate. *LWT-Food Science and Technology*, 42: 606-611.
- Tang, C-H., Wang, X-Y., Yang, X-Q. e Li, L. (2009). Formation of soluble aggregates from insoluble commercial soy protein isolate by means of ultrasonic treatment and their gelling properties. *Journal of Food Engineering*, 92: 432-437.
- Tobitani, A. e Ross-Murphy, S.B. (1997). Heat-induced gelation of globular proteins. 1. Model for the effects of time and temperature on the gelation time of BSA gels. *Macromolecules*, 30: 4845-4854.
- Utsumi, S., Damodaran, S. e Kinsella, J.E. (1984). Heat-induced Interactions Between Soybean Proteins: Preferential Association of 11S-basic Subunits and β -subunits of 7S. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32: 1406-1412.
- Wagner, J.R., Sorgentini, D.A. e Añón, M.C. (1992). Effect of physical and chemical factors on rheological behavior of commercial soy protein isolates: protein concentration, water imbibing capacity, salt addition and thermal treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 1930-1937.
- Wagner, J.R., Sorgentini, D.A. e Añón, M.C. (1996). Thermal and Electrophoretic Behavior,

Hydrophobicity, and Some Functional Properties of Acid-Treated Soy Isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 1881-1889.

Wagner, J.R., Sorgentini, D.A. e Añón, M.C. (2000). Relation between Solubility and Surface Hydrophobicity as an Indicator of Modifications during Preparation Processes of Commercial and Laboratory-Prepared Soy Protein Isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 3159-3165.

Wang, X-S., Tang, C-H., Li, B-S., Yang, X-Q., Li, L. e Ma, C-Y. (2008). Effects of high-pressure treatment on some physicochemical and functional properties of soy protein isolates. *Food Hydrocolloids*, 22: 560-567.

Yamagishi, T., Miyakawa, A., Noda, N. e Yamauchi, F. (1983). Isolation and electrophoretic analysis of heat-induced products of mixed soybean 7S and 11S globulins. *Agricultural and Biological Chemistry*, 47: 1229-1237.

Yamauchi, F., Yamagishi, T.Y. e Iwabushi, S. (1991). Molecular understanding of heat-induced phenomena of soybean protein. *Food Review International*, 7: 283-322.

CAPÍTULO 3

Modificação das propriedades gelificantes das
proteínas de soja por adição de galactomananas:
Efeito do grau de ramificação e da massa
molecular do polissacarídeo

Embora na última década, as proteínas de soja tenham despertado o interesse da comunidade científica, nos últimos cinco anos poucos trabalhos têm sido dedicados ao conhecimento mais profundo das propriedades gelificantes destas proteínas e sua interação com polissacarídeos.

O trabalho descrito neste capítulo centra-se na caracterização do efeito de polissacarídeos neutros nas propriedades funcionais de proteínas de soja, principalmente na gelificação, uma das estratégias selecionadas no âmbito do objetivo principal desta tese: o melhorar/alargar as propriedades funcionais das proteínas de soja, através da utilização e combinação de diferentes estratégias já demonstradas como úteis para a manipulação da funcionalidade destas proteínas.

Assim, estudou-se o efeito da adição de galactomananas (GM) com diferentes propriedades estruturais (grau de ramificação, em virtude da diferente origem das GM, e massa molecular) nas propriedades gelificantes e na microestrutura de géis de isolados de proteína de soja (IPS) a pH 7 e a baixa força iónica. Os polissacarídeos selecionados foram GM, polissacarídeos neutros largamente utilizados como espessantes e estabilizantes em formulações alimentares, cuja influência na funcionalidade proteica ainda está pouco documentada na literatura.

Neste âmbito, com este trabalho pretendeu-se também contribuir para um melhor conhecimento e controlo das propriedades reológicas e estruturais resultantes da agregação, gelificação e separação de fases de biopolímeros em sistemas alimentares.

Este capítulo consta de duas partes: uma onde se descreve a purificação de três amostras de GM comerciais, goma de alfarroba (GA), goma de guar (GG) e goma de tara (GT), a produção de GA com diferentes massas moleculares, por hidrólise enzimática controlada e a caracterização físico-química e reológica destes polissacarídeos; e uma segunda parte onde se descrevem os efeitos das propriedades estruturais das GM nas propriedades gelificantes e na microestrutura dos géis proteicos de IPS.

3.1 Introdução

Nesta seção é apresentada uma revisão bibliográfica sobre galactomananas e sua modificação estrutural por hidrólise enzimática. No seguimento, descrevem-se, de forma superficial, as propriedades reológicas destes polissacarídeos.

Tendo em conta o objetivo global deste capítulo, é ainda revista a informação disponível acerca do efeito de galactomananas nas propriedades funcionais das proteínas de soja.

3.1.1 Galactomananas

As GM são polissacarídeos de reserva encontrados no endosperma das sementes de muitas plantas do género *Leguminosae*. Comercialmente são utilizadas as GM de alfarroba (*Ceratonia siliqua*), de guar (*Cyamopsis tetragolobus*) e de tara (*Caesalpineia spinosa*). Na Tabela 3.1 comparam-se as três gomas, no que respeita à composição das suas sementes.

Tabela 3.1 – Composição das sementes (% peso seco)

<i>Goma</i>	<i>Casca</i>	<i>Endosperma</i>	<i>Embrião</i>
Alfarroba	30-33	42-46	23-25
Guar	14-17	35-42	43-47
Tara	39,5-41	25-27	25,5-27

Adaptado de Panegassi *et al.* (2000)

Estas gomas, especialmente a de guar e alfarroba são largamente utilizadas na indústria alimentar devido às suas propriedades espessantes pois têm a capacidade de formar soluções aquosas estáveis (Neukom, 1989), muito viscosas mesmo em concentrações relativamente baixas, as quais, a temperaturas moderadas, são pouco afetadas pelo pH (Lazaridou *et al.*, 2001) e presença de iões. Contudo, tratamentos térmicos a temperaturas elevadas (100 °C e pH a variar entre 5.0 e 9.0) promovem o decréscimo significativo dos valores da viscosidade das soluções de GA e de GG como resultado da despolimerização causada pela temperatura elevada (Kok, 2010).

As GM são heteropolissacarídeos constituídos por uma cadeia linear de resíduos de β -(1 \rightarrow 4)-D-manopiranosilo parcialmente substituídos por resíduos terminais de α -D-galactopiranosilo ligados em 1 \rightarrow 6 (Figura 3.1).

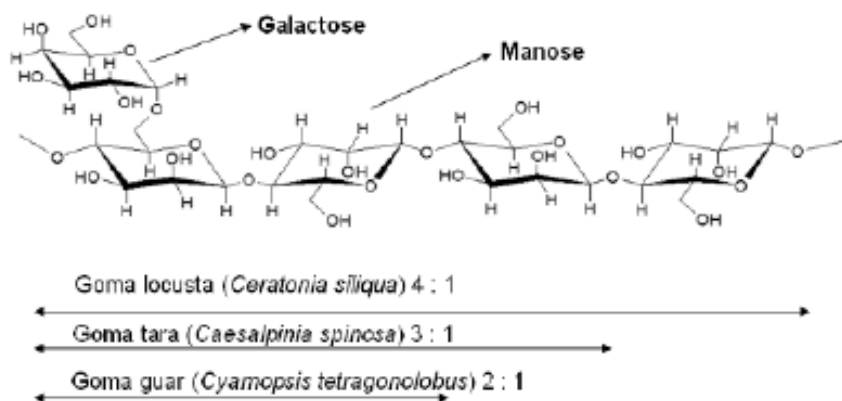


Figura 3.1 – Composição e distribuição das unidades monossacarídicas das galactomananas utilizadas comercialmente (Dea e Morrison, 1975; McCleary *et al.*, 1981; Neukom, 1989)

As principais diferenças entre as estruturas destas três GM são as razões manose/galactose (man/gal) e a distribuição dos resíduos de galactose ao longo da cadeia principal de manose (Figura 3.1).

As propriedades funcionais das GM em dispersões aquosas e nos produtos finais em que se inserem dependem das suas características estruturais, como sejam o número e tipo de distribuição dos monómeros de galactose ao longo da cadeia de manose e a sua massa molecular (Deuel e Neukom, 1954; Neukom, 1989; Richardson *et al.*, 1998). Refira-se ainda que as propriedades moleculares acima referidas são determinantes para o comportamento reológico destes biopolímeros, para a capacidade de se autoassociarem e ainda para a interação com outros polissacarídeos (McCleary *et al.*, 1981; McCleary *et al.*, 1985; Lazaridou *et al.*, 2001).

Na GA existem em média quatro unidades de manose por cada unidade de galactose. A distribuição dos resíduos de galactose não é regular, apresentando-se maioritariamente em blocos, mas também distribuída ao acaso ou com alguma ordenação (Daas *et al.*, 2000). O polissacarídeo constituinte da GG é semelhante ao da GA, diferindo apenas na razão man/gal e na forma de distribuição das cadeias laterais. A razão man/gal é neste caso de cerca de 1.5 e a distribuição dos resíduos de galactose ao longo da cadeia de manana é

essencialmente ao acaso (McCleary *et al.*, 1985; Daas *et al.*, 2000). No que respeita à GT a galactomanana que a constitui tem uma razão man/gal de cerca de 3.

Devido às diferentes características estruturais, nomeadamente o grau de ramificação, as GM obtidas da alfarroba, guar e tara apresentam diferente solubilidade em água uma vez que esta propriedade depende essencialmente do conteúdo em galactose, como foi demonstrado através da remoção seletiva de unidades de galactose por α -galactosidase (McCleary *et al.*, 1981; Pitkanen *et al.*, 2011). Quanto maior o conteúdo em resíduos de galactose maior a solubilidade do polissacarídeo em água. As cadeias laterais de galactose provocam uma “extensão” da cadeia principal de manose e evitam a formação de agregados insolúveis, resultantes do estabelecimento de ligações de hidrogénio entre zonas da cadeia principal de resíduos de manose. Assim, a solubilidade da GT é intermédia das restantes duas gomas, sendo que a GA se dissolve a uma temperatura mais elevada que as restantes gomas (Neukom, 1989).

3.1.2 Modificação estrutural de galactomananas por hidrólise enzimática

A arquitetura estrutural e química das GM pode ser fácil e seletivamente alterada de forma a melhorar e desenvolver formulações deste polissacarídeo, abrindo novas oportunidades de aplicação.

Vários estudos sobre a despolimerização de polissacarídeos têm sido realizados devido ao elevado interesse e utilização de novas matérias-primas para a produção de alimentos, óleos e produtos químicos, bem como para o desenvolvimento e melhoramento dos processos produtivos.

Tayal *et al* (1999), Cheng *et al* (2002) e Funami *et al.* (2005) realizaram trabalhos com a goma de guar e demonstraram a versatilidade deste polímero para a despolimerização por diferentes mecanismos de degradação, nomeadamente, a irradiação por ultrassons, a hidrólise química e enzimática.

Tendo em conta o objetivo do presente trabalho, apenas se aborda a modificação estrutural por hidrólise enzimática.

Nas GM existem três tipos de ligações suscetíveis à hidrólise enzimática: as ligações endo- e exo- β -1,4 do esqueleto principal da GA e as ligações α -1,6 entre as unidades de manose

e as cadeias laterais de galactose (Figura 3.2). As enzimas que clivam estas ligações são, respectivamente, a endo- e exo- β -mananase e a α -galactosidase.

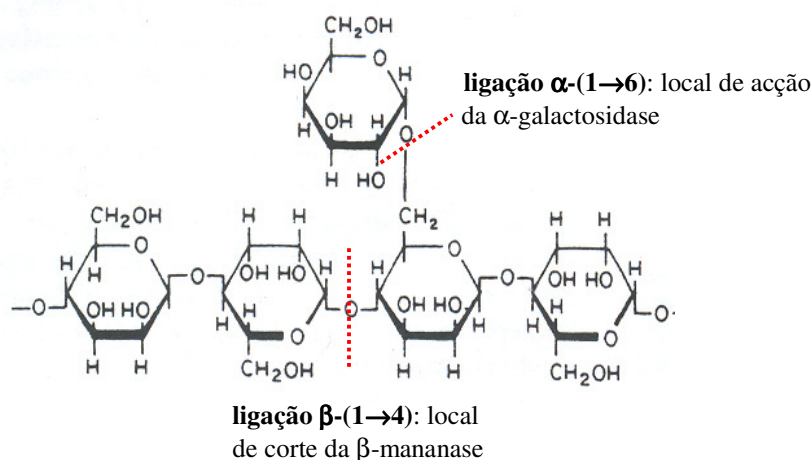


Figura 3.2- Representação esquemática das ligações suscetíveis à ação enzimática da β -mananase e da α -galactosidase.

Neste trabalho, para se obterem amostras de GM com diferentes massas moleculares, selecionou-se a GA purificada e procedeu-se à sua hidrólise enzimática controlada com β -mananase.

A hidrólise enzimática de polímeros naturais com β -mananase é um processo complexo que envolve alterações significativas na viscosidade das soluções à medida que a macromolécula vai sendo progressivamente degradada em unidades de menor massa molecular (Tayal *et al.*, 1999; Cheng e Prud'homme, 2000; Cheng *et al.*, 2002).

Sendo a degradação de polímeros amplamente estudada, vários modelos foram sendo propostos ao longo do tempo. Inicialmente foi apresentado (Tayal *et al.*, 1999) um modelo segundo o qual todas as ligações do polissacarídeo teriam igual probabilidade de serem clivadas, o que resultaria, portanto, numa degradação ao acaso. Modelos analíticos subsequentes, propuseram a existência de polidispersidade de massas moleculares durante a degradação enzimática, tendo-se considerado que a clivagem das ligações seria uma função do comprimento da cadeia, bem como da localização das ligações no interior da cadeia do polissacarídeo (Cheng e Prud'homme, 2000).

Estudos realizados sobre hidrólise enzimática em galactomananas demonstraram que o acesso enzimático aos locais de clivagem no polímero é influenciado por diferentes

variáveis, nomeadamente, concentração do polímero, concentração da enzima e grau de ramificação.

Com o aumento da concentração do polissacarídeo, a velocidade da reação enzimática diminui como resultado do decréscimo da mobilidade enzimática ao longo do polissacarídeo (Cheng *et al.*, 2002). Para baixas concentrações de GG (< 0.03%), a velocidade da reação enzimática aumenta com a concentração do substrato (cinética de primeira ordem). Porém, para valores intermédios de concentração de GG (0.05-3 %), Cheng *et al.* (2000) constataram que a velocidade da reação tornou-se independente da concentração de substrato e o progressivo aumento da concentração de polissacarídeo (> ~5 %) provocou um decréscimo da velocidade de reação enzimática.

Relativamente à concentração de enzima, Cheng *et al.* (2002) constataram que para baixas concentrações enzimáticas, as cadeias do polímero mais próximas da enzima são preferencialmente clivadas em detrimento das cadeias do polissacarídeo que estão mais afastadas, sendo tal situação mais pronunciada à medida que se aumenta o tempo de hidrólise. Assim sendo, as frações obtidas apresentam massas moleculares polidispersas.

No que diz respeito ao grau de ramificação, constatou-se que a hidrólise de galactomananas é fortemente influenciada pela quantidade de resíduos de galactose ligados ao esqueleto principal de manose (Dea e Morrison, 1975). Estudos efetuados permitiram inferir que a enzima β -mananase apresenta elevada atividade nas regiões não substituídas da cadeia principal existindo, conseqüentemente, diferenças de reatividade ao longo da cadeia do polímero, o que sugere uma degradação não aleatória, resultando na acumulação de pequenos fragmentos e uma dispersidade significativa nas massas moleculares das frações hidrolisadas.

3.1.3 Propriedades reológicas de galactomananas

As galactomananas devem grande parte da sua utilização na área alimentar à sua capacidade para aumentarem a viscosidade do meio aquoso onde se incorporam, essencialmente devido à sua elevada massa molecular, uma característica comum à maioria dos polissacarídeos.

O conhecimento das propriedades de escoamento de soluções aquosas ou dispersões de polissacarídeos é essencial para a compreensão da origem molecular do processo de

espessamento e de importância relevante para a aplicação industrial destes biopolímeros. A viscosidade, assim como outras propriedades funcionais dos biopolímeros, depende essencialmente da forma como o polímero ocupa o espaço disponível, ou seja, da sua conformação e, das interações que pode estabelecer com o solvente e/ou com outras moléculas vizinhas.

A viscosidade intrínseca ($[\eta]$) é um parâmetro fundamental para a interpretação do comportamento reológico em escoamento exibido por soluções de polímeros. Esta propriedade, característica de determinada molécula isolada em determinado solvente, relaciona-se com o volume hidrodinâmico ocupado pela macromolécula, dependendo essencialmente da massa molecular, pH, conformação da macromolécula e “qualidade” do solvente onde se encontra.

A viscosidade intrínseca das soluções de GM está muito dependente do seu grau de ramificação e massa molecular. Assim, para a mesma massa molecular a viscosidade intrínseca aumenta com a diminuição do grau de ramificação e para amostras com o mesmo grau de ramificação a viscosidade intrínseca diminui drasticamente com a diminuição da massa molecular (McCleary *et al.*, 1981; Beer *et al.*, 1999; Monteiro *et al.*, 2005; Tavares *et al.*, 2005).

A viscosidade intrínseca define-se como:

$$[\eta] = \left(\frac{(\eta - \eta_s)}{\eta_s c} \right)_{c \rightarrow 0} \quad (3.1)$$

sendo η_s a viscosidade do solvente, η a viscosidade da solução do polímero e C a concentração do polímero.

Para a determinação desta grandeza, normalmente recorre-se à aplicação das equações de Huggins (Equação 3.2) e de Kraemer (Equação 3.3):

$$\eta_{sp}/c = [\eta] + K' [\eta]^2 C \quad (3.2)$$

$$(\ln \eta_{rel})/c = [\eta] + K'' [\eta]^2 C \quad (3.3)$$

sendo η_{sp} a viscosidade específica, η_{rel} a viscosidade relativa, C a concentração da solução do polímero e K' e K'' as constantes de Huggins e de Kraemer, respectivamente.

Valores de viscosidade intrínseca de diferentes GM estão descritos na literatura (Lopes da Silva e Gonçalves, 1990; Higiro *et al.*, 2007; Chenlo *et al.*, 2009), mostrando uma evidente dependência do valor deste parâmetro face ao grau de ramificação da GM: por exemplo, 13.7 dL/g e 16.2 dL/g, valores de viscosidade em água a 25 °C, da GA e GG, respectivamente (Lopes da Silva e Gonçalves, 1990). Saliente-se que variações nos valores da viscosidade intrínseca das GM são encontradas na literatura e atribuídas a variações no grau de agregação existentes entre as moléculas dos polissacarídeos.

As GM, sendo polissacarídeos de elevada massa molecular e que assumem conformações essencialmente desordenadas em solução aquosa, apresentam o comportamento típico das soluções de biopolímeros. Assim, soluções diluídas de GM exibem, geralmente, comportamento típico de fluídos newtonianos, onde a tensão de corte é diretamente proporcional à taxa de deformação da amostra, o que significa que a viscosidade é constante. À medida que a concentração de polissacarídeo aumenta o seu comportamento torna-se reofluidificante, em que a viscosidade diminui com o aumento da taxa de deformação imposta ao sistema. Este comportamento pode ser explicado com base no conceito do entrelaçamento macromolecular que, à medida que a taxa de deformação imposta à amostra aumenta, vai sendo desfeito e as moléculas vão-se alinhando no sentido do escoamento (Lopes da Silva *et al.*, 2004). O grau de entrelaçamento das moléculas depende da concentração e do volume hidrodinâmico da molécula traduzindo-se pelo denominado parâmetro de interpenetração molecular, $C[\eta]$. Este parâmetro adimensional, indicativo do volume ocupado por determinada macromolécula em solução, é frequentemente utilizado para generalizar o comportamento de diferentes biopolímeros (Lapasin e Prich, 1999).

Diversos modelos matemáticos podem ser aplicados para descrever o comportamento reofluidificante de soluções de biopolímeros. Entre os mais utilizados, com resultados satisfatórios, encontram-se os modelos de Cross (Equação 3.4) e de Carreau (Equação 3.5):

$$\eta = \eta_{\infty} + (\eta_0 - \eta_{\infty}) / (1 + \alpha \dot{\gamma}^m) \quad (3.4)$$

$$\eta = \eta_{\infty} + (\eta_0 - \eta_{\infty}) / (1 + (\lambda \dot{\gamma})^2)^N \quad (3.5)$$

sendo η a viscosidade aparente, η_0 a viscosidade a taxa de deformação nula, η_{∞} a viscosidade a taxa de deformação infinita, $\dot{\gamma}$ a taxa de deformação, α e λ tempos de relaxação característicos, e m e N constantes.

Vários trabalhos demonstraram a aplicação satisfatória destes modelos para descrever o escoamento de soluções de GM (Doublier e Launay, 1981; Lopes da Silva e Gonçalves, 1990; Rayment *et al.*, 1997; Sittikijyonthin *et al.*, 2005; Pollard *et al.*, 2008; Bourbon *et al.*, 2010; Chenlo *et al.*, 2010) e de misturas de GM com outros biopolímeros (Rayment *et al.*, 1997; Alves *et al.*, 2001; Pollard *et al.*, 2008).

Um outro tipo de ensaios reológicos, em regime oscilatório, a baixa amplitude de deformação, é útil para o estudo de soluções de polissacarídeos uma vez que permite avaliar o tipo de organização destas macromoléculas, incluindo aspetos conformacionais e interações intermoleculares.

Uma das análises mais frequentes é a avaliação da variação dos módulos viscoelásticos (G' e G'') com a frequência de oscilação (ω) a que o sistema é submetido – o resultado deste tipo de ensaio denomina-se espectro mecânico.

Em geral, para soluções diluídas de polissacarídeos, incluindo as GM, e para baixas frequências de oscilação, o carácter viscoso do sistema é muito elevado sendo o módulo de perda superior ao módulo de armazenamento. À medida que a concentração do polissacarídeo ou a frequência de oscilação aumentam, G' e G'' aumentam, sendo que o primeiro aumenta mais rapidamente com a frequência do que o segundo, podendo eventualmente cruzar-se caso o carácter sólido da amostra supere o seu carácter viscoso, devido à presença de elevado número de cadeias de elevada massa molecular e/ou devido ao tempo de solicitação inferior ao tempo de relaxação característico do sistemas (elevadas frequências).

As propriedades estruturais, como a massa molecular, o grau de ramificação e a distribuição das unidades de galactose ao longo da cadeia de manana podem influenciar as propriedades viscoelásticas das soluções de GM (Clark e Ross-Murphy, 1987; Funami *et al.*, 2005; Funami *et al.*, 2008; Monteiro, 2006).

A diminuição da massa molecular resulta na diminuição dos módulos viscoelásticos e numa maior dependência dos módulos face à frequência de oscilação. Por exemplo,

diminuindo a massa molecular da GA, em cerca de 60 %, obtém-se um comportamento predominantemente líquido, onde G'' é superior a G' em toda a gama de frequências de oscilação analisadas (Monteiro, 2006). Por outro lado, a remoção de mais de 50 % das unidades de galactose da GG modifica de tal forma as propriedades viscoelásticas das soluções deste polissacarídeo que os seus espectros mecânicos tornam-se similares aos de verdadeiros géis em que praticamente não há variação de G' em função da frequência, dentro da gama estudada (Wientjes *et al.*, 2001).

3.1.4 Efeito de galactomananas nas propriedades gelificantes de proteínas de soja

Diversos estudos demonstraram propriedades vantajosas dos sistemas mistos contendo GM e outros polissacarídeos, nomeadamente pectinas (Lopes da Silva *et al.*, 1996), goma xantana (Fernandes, 1995; Schorsch *et al.*, 1997; Lazaridou *et al.*, 2000; Sandolo *et al.*, 2010), carrageninas (Andrade *et al.*, 2000; Pinheiro *et al.*, 2011) e amido (Rayment *et al.*, 1995), mas também com proteínas, como por exemplo, gelatina (Alves *et al.*, 2001), proteínas do soro do leite (Tavares e Lopes da Silva, 2003; Gonçalves *et al.*, 2004; Tavares *et al.*, 2005; Monteiro *et al.*, 2005; Sittikijyothin *et al.*, 2010) e, em menor escala, com proteínas de soja (Sánchez *et al.*, 1995; Hua *et al.*, 2003).

A discussão da informação disponível na literatura acerca de trabalhos realizados para misturas de proteínas de soja e galactomananas foi já abordada no capítulo 1, § 1.4.2.

O conhecimento atual sobre a gelificação de proteínas de soja com polissacarídeos neutros revela-se pobre e, nos últimos anos, poucos trabalhos contribuíram para aumentar o conhecimento acerca destes sistemas. Torna-se assim imperativo compreender e aprofundar o conhecimento sobre as condições externas e o efeito das características estruturais deste tipo de polissacarídeo na gelificação dos sistemas mistos contendo proteínas de soja.

Neste trabalho, estudou-se o efeito da adição de polissacarídeos neutros, galactomananas, na gelificação e outras propriedades estruturais e funcionais de proteínas de soja, dando especial relevância ao efeito da diferente massa molecular e grau de ramificação do polissacarídeo.

3.2 Material e Métodos

3.2.1. Amostras

A GA (LBG HG M200) foi cedida pela *INDAL* (Indústrias de Alfarroba, Lda – Faro, Portugal.). A GG (Meypro Guar CSAA, M175) foi fornecida pela Meyhall Chemicall, Suíça. A GT foi cedida pelo laboratório do Dr. Paul Cairns (Institute of Food Research, Reino Unido).

Para a realização deste trabalho, selecionou-se um isolado de proteínas de soja obtido laboratorialmente de forma a evitar um elevado grau de desnaturação, o que desencadeia, como se constatou pelos resultados descritos no capítulo 2, um elevado grau de agregação e, consequentemente maior dificuldade em obter soluções concentradas necessárias para a realização das misturas entre o IPS e as GM. Entre os isolados obtidos laboratorialmente, escolheu-se o isolado obtido a partir de farinha de soja desengordurada e seca (IPS 4), de acordo com a seção 2.2.2.2., com o objetivo de valorizar um subproduto da indústria alimentar. A caracterização desta amostra foi já descrita no Capítulo 2 desta tese.

3.2.2 Preparação das amostras de polissacarídeos

3.2.2.1 Purificação das amostras comerciais

Um dos problemas que ocorre com as gomas comerciais existentes no mercado é o facto de existir uma grande variabilidade na sua qualidade, resultante da diferente origem e eficiência do processamento das amostras, o que depois se manifesta na variação das propriedades funcionais das gomas quando inseridas nos sistemas alimentares. Uma forma de reduzir o problema é purificar os polissacarídeos comerciais. A purificação destes polissacarídeos reduz ou elimina o sabor desagradável das gomas comerciais assim como clarifica as soluções destas gomas devido à eliminação das impurezas e enzimas (Lopes da Silva e Gonçalves, 1990).

As amostras comerciais de goma de alfarroba (GAcom), guar (GGcom) e tara (GTcom) foram adicionadas lentamente a água destilada sob agitação, mantendo-se a agitação moderada durante 1 h, à temperatura ambiente. Após este período, as dispersões foram

aquecidas em banho de água a 90 °C, para a GA e GT, e a 70 °C para a GG, sob agitação durante 30 min. Depois de arrefecidas as soluções foram centrifugadas a 24400 g, durante 30 min, a 20 °C.

Depois de centrifugadas, as soluções das gomas (≈ 0.5 %, m/v) foram adicionadas lentamente a etanol destilado (final 80 %, v/v), tendo-se obtido um precipitado branco e amorfo essencialmente constituído por galactomananas. Após 12 h a 4 °C, o precipitado foi filtrado em filtro de placa de vidro porosa (G2), lavado com etanol e acetona e seco em estufa, a 35 °C, durante a noite. As amostras assim obtidas foram pulverizadas com o auxílio de um almofariz e pilão e guardadas em exsiccador.

As gomas purificadas (GApur, GGpur e GTpur) foram utilizadas para os ensaios de caracterização reológica e para avaliar o efeito do grau de ramificação na capacidade gelificante do isolado de proteínas de soja. A amostra de GA foi ainda utilizada para a obtenção de amostras de GM com diferentes massas moleculares, por tratamento enzimático com β -mananase (§ 3.2.2.2).

3.2.2.2 Modificação enzimática da goma de alfarroba com β -mananase

A enzima endo- β -mananase (Megazyme Inc., Irlanda) foi utilizada para fragmentar as ligações β -1,4 da cadeia principal da GA. A enzima comercial, fornecida numa suspensão de sulfato de amónio, foi diluída de forma a obter-se a solução enzimática na concentração pretendida: Adicionou-se 5 μ L da suspensão enzimática a 10 mL de tampão de acetato/ácido acético 0.1 mol/L, pH 5. A solução preparada foi conservada no congelador.

Previamente à reação de hidrólise enzimática, preparou-se uma solução de GA 0.5 g/L, adicionando lentamente, a quantidade necessária de polissacarídeo ao solvente (água destilada), sob agitação vigorosa. Aproximadamente 0.02 % de azida de sódio (NaN_3) foi adicionada como conservante. Manteve-se a dispersão a agitar durante 1 h e seguidamente colocou-se num banho de água a 90 °C, onde se manteve em agitação durante 30 min. A solução resultante, depois de arrefecida à temperatura ambiente, foi centrifugada durante 20 min a 24400 g (20 °C), sendo recolhido o sobrenadante.

A reação de hidrólise foi realizada num recipiente fechado, o qual foi colocado num banho de água à temperatura constante de 40 °C (temperatura correspondente à atividade enzimática máxima).

A solução de endo- β -mananase foi adicionada à solução de GA de modo a obter-se uma atividade enzimática de 2×10^{-4} U/mL de solução de GA (uma unidade de atividade corresponde à quantidade de enzima necessária para libertar uma micromole de produto por minuto a pH 5 a 40 °C) (McCleary *et al.*, 1981; Pai e Khan, 2002). De forma análoga, preparou-se uma amostra de referência, à qual foi adicionado tampão de acetato/ácido acético 0.1 mol/L, pH 5, em volume equivalente ao adicionado de solução enzimática.

A reação de hidrólise decorreu sob agitação e durante diferentes períodos de tempo (10, 30, 60, 120, 180, 960 e 1200 min), de modo a obterem-se amostras de GA com diferentes massas moleculares. Após o tempo de incubação pretendido, as misturas foram aquecidas a 100 °C durante 10 min, para desnaturação da enzima e paragem da reação. Cada fração, incluindo a correspondente ao controlo, depois de arrefecida à temperatura ambiente, foi centrifugada durante 30 min a 24400 g (20 °C) e, seguidamente, o polissacarídeo foi recuperado por precipitação em excesso de etanol. Os precipitados obtidos foram acondicionados em câmara fria (4 °C) por 12 h, sendo posteriormente lavados com etanol e acetona. Procedeu-se à filtração de cada precipitado e deixou-se secar a 35 °C durante a noite. As amostras secas foram pulverizadas a um pó fino e armazenadas num exsiccador.

3.2.3 Preparação de soluções

3.2.3.1 Preparação de soluções de galactomananas

Para os ensaios reológicos e para a preparação das misturas de GM com proteínas de soja, as amostras de polissacarídeos foram dissolvidas em água ultrapura *Mili-Q* (resistividade 18.2 M Ω cm) obtida através de um sistema de purificação da *Milipore Corp.* Utilizou-se azida de sódio (0.02 % m/v) como conservante das soluções. O método de dissolução foi semelhante ao descrito em § 3.2.2.1. Prepararam-se soluções com diferentes concentrações, cada diluição foi homogeneizada por agitação lenta durante 30 min e desgaseificada a pressão reduzida, com auxílio de uma trompa de água. A concentração

final das soluções foi calculada por determinação de sólidos totais dissolvidos, após secagem das dispersões a 105 °C até se obter massa constante.

As soluções de polissacarídeos, mantidas à temperatura ambiente, foram testadas no máximo até dois dias após a sua preparação, para evitar os efeitos de agregação das moléculas do biopolímero.

3.2.3.2 Preparação de dispersões de isolado de proteína de soja

Para a realização deste trabalho utilizou-se o IPS obtido laboratorialmente (IPS4). O método de dissolução do isolado proteico foi semelhante ao descrito em § 2.2.4.1.

Prepararam-se dispersões com diferentes concentrações de proteína, homogeneização por agitação lenta durante 30 min e degaseificação a pressão reduzida. Para avaliar o efeito das propriedades estruturais das GM foram selecionadas duas concentrações proteicas: 6 % (m/v), concentração inferior à concentração crítica de gelificação e 10 % (m/v), concentração superior à concentração crítica de gelificação. O pH das dispersões foi mantido a 7. As dispersões de IPS foram mantidas a 4 °C e utilizadas no máximo até 4 dias após a sua preparação.

3.2.3.3 Preparação de misturas GM/IPS

As misturas de GM e IPS efetuaram-se por mistura de soluções de cada biopolímero, com concentração inicial e em proporção mássica adequadas para a concentração final pretendida. Cada mistura, após ajuste a pH 7 (quando necessário), foi submetida a agitação lenta durante 30 min, à temperatura ambiente, e degaseificada a pressão reduzida. Foram estudadas misturas com concentrações proteicas de 6 % e 10 % e concentrações de GM de 0.2 % e 0.5 % (m/v), a pH neutro e baixa força iónica.

3.2.4 Caracterização físico-química dos polissacarídeos

3.2.4.1 Determinação de cinzas, humidade e proteínas

Os teores de humidade e cinzas das amostras de GM comerciais e purificadas foram determinados de acordo com o “*Food Chemicals Codex*” (1981). Todas as determinações foram feitas em triplicado.

Para a determinação da humidade, as amostras foram colocadas numa estufa a 105 °C durante a noite e, posteriormente, até se verificar uma variação de massa igual ou inferior a 0.005 g entre pesagens consecutivas.

Para a determinação das cinzas, incineraram-se as amostras, previamente secas, numa mufla a 650 °C durante 4 h.

A quantidade de proteína existente nestas amostras foi determinada por quantificação de azoto pelo método de Kjeldahl, utilizando como fatores de conversão de azoto em proteína ($N \times 5.87$) para a GA, 5.92 para a GG e 6.31 para a GT (Anderson, 1986).

3.2.4.2 Determinação de massas moleculares das galactomananas por GPC

A análise por GPC das frações obtidas foi realizada num aparelho PL-GPC 110 system (Polymer Laboratories Ltd, U.K.) equipado com pré-coluna Plaguagel-OH 15 µm e duas colunas em série Plaguagel-OH 40. 15 µm, 300 x 7.5 mm e Plaguagel-OH 60, 15 µm, 300 x 7 mm, e detetor de índice de refração. O sistema de injeção e colunas foi mantido a 40 °C, e o fluxo do eluente (NaNO_3 0.1 mol/L com NaN_3 0.02 %) foi de 0.9 mL/min.

As soluções das gomas, purificadas e modificadas enzimaticamente com β -mananase, foram preparadas de acordo com o procedimento descrito em § 3.2.3.1, com concentrações entre 0.1 % e 0.3 % (m/v). Todas as soluções, antes de injetadas, foram filtradas com filtro 0.45 µm.

As colunas foram calibradas com padrões de pululanos comerciais com massas moleculares entre 7.38 e 1600 kDa, obtendo-se posteriormente a respetiva curva de calibração.

A massa molecular média em massa (M_w), a massa molecular média em número (M_n) e a polidispersidade foram determinadas por *software* do equipamento.

3.2.4.3 Determinação da viscosidade intrínseca

Para a determinação da viscosidade intrínseca ($[\eta]$), calcularam-se as viscosidades relativa (η_{rel}) e específica (η_{sp}) de soluções com diferentes concentrações de cada GM em estudo, com base nos tempos de escoamento medidos com um viscosímetro capilar de Cannon-Fenske, à temperatura de 25.0 ± 0.1 °C. As concentrações das soluções de GM utilizadas foram selecionadas de forma a que a viscosidade relativa (η_{rel}) se enquadrasse no intervalo $1.2 < \eta_{rel} < 2.0$ (Morris *et al.*, 1981), uma vez que nestas condições a viscosidade é essencialmente newtoniana. A viscosidade intrínseca foi obtida por aplicação das equações de Huggins (equação 3.2) e Kraemer (equação 3.3), já mencionadas na seção 3.1.3.

3.2.4.4 Determinação da razão manose/galactose

A razão manose/galactose (man/gal) das amostras de GM foi calculada determinando a quantidade de açúcares neutros sob a forma de acetatos de alditol por cromatografia em fase gasosa, seguindo o procedimento descrito por Blakeney *et al.* (1983).

Cada amostra foi incubada, à temperatura ambiente, com ácido sulfúrico 72 % por 3 h, após o que se adicionou água destilada de modo a diluir o ácido e hidrolisou-se a amostra a 120 °C por 1 h. Em seguida, os monossacarídeos obtidos foram convertidos em acetatos de alditol por ação de borohidreto de sódio e anidrido acético. Os acetatos de alditol foram dissolvidos em acetona anidra e analisados por cromatografia de gás utilizando como padrão interno a 2-desoxi-glucose.

O cromatógrafo utilizado foi Carlo Erba 6000 série 2 com detetor FID, equipado com uma coluna DB – 225 (J&W) com 30 m de comprimento, 0.25 mm de diâmetro interno e 0.15 µm de espessura de filme. O gás de arraste foi o hidrogénio com uma velocidade de fluxo de 1 mL/min. Depois da injeção a temperatura foi mantida a 220 °C durante 4 min sendo depois aumentada, a 25 °C/min, até aos 230 °C onde se manteve durante 6,10 min. As temperaturas do injetor e do detetor mantiveram-se nos 220 ° e 230 °C respetivamente.

A identificação e quantificação dos resíduos de manose e galactose foram efetuadas por comparação dos tempos de retenção com o de padrões de referência, também derivatizados a acetatos de alditol.

3.2.5 Caracterização Reológica

3.2.5.1 Equipamento

Todos os ensaios foram efetuados em reômetros de tensão controlada, Bohlin CVO 120HR (Figura 3.3) ou TA-AR1000 (Figura 3.4), equipados com sistemas de Peltier de controlo de temperatura e sistemas de medida cone-placa e placa-placa, dependendo do tipo de ensaio.



Figura 3.3 – Reômetro Bohlin CVO 120 HR



Figura 3.4 – Reômetro TA-AR1000

3.2.5.2 Métodos reológicos utilizados

3.2.5.2.1 Caracterização das soluções de polissacarídeos

Estudou-se o comportamento das soluções de polissacarídeos (preparadas de acordo § 3.2.3.1) com várias concentrações utilizando como sistema de medida geometrias cone-placa com diferentes dimensões, de forma a ser possível submeter a amostra a baixas tensões: para as soluções mais diluídas usou-se um cone de acrílico com 60 mm de

diâmetro, 2° de ângulo e 54 µm de truncamento e, para as mais concentradas, um cone em aço inoxidável de diâmetro 40 mm e ângulo de 4°, 92 µm de truncamento.

As amostras, após agitação e desgaseificação, foram colocadas na placa fixa do reômetro e foram realizados ensaios de oscilação (varrimentos de frequência de 0.05 a 100 rad/s) e de escoamento (gama de tensões de corte variáveis dependendo da viscosidade da amostra), à temperatura de 25 °C. Em todos os ensaios efetuados cobriu-se a superfície exposta da amostra com óleo mineral de baixa viscosidade, com o objetivo de evitar a evaporação do solvente.

3.2.5.2.2 Caracterização dos géis de IPS e das misturas IPS/GM

Os métodos reológicos para caracterização dos géis de IPS e de misturas de IPS com GM envolveram dois tipos de ensaios: ensaios de varrimento em temperatura, realizados no reômetro TA e ensaios isotérmicos a 80 °C, realizados no equipamento de marca Bohlin, essencialmente como já descritos em § 2.2.4.2 e 2.2.4.3.

No primeiro caso, utilizou-se como sistema de medida uma geometria placa-placa com uma placa superior com 40 mm de diâmetro. As amostras, após homogeneização e desgaseificação, foram colocadas na placa inferior a 40 °C e de seguida fez-se aumentar a temperatura até 95 °C a uma velocidade de 1 °C/min, registando-se a evolução dos módulos viscoelásticos em função da temperatura, a uma frequência de oscilação de 5 rad/s e 1 % de deformação, para sistemas com uma concentração de proteína de 10 % e 0.4 % de deformação, para os sistemas contendo 6 % de proteína. O valor da deformação foi selecionado com base em resultados de ensaios de varrimento em deformação que permitiram identificar a zona de comportamento viscoelástico linear. No final da rampa ascendente de temperatura, manteve-se a temperatura a 95 °C durante 10 min e de seguida fez-se descer a temperatura até 20 °C nas mesmas condições de velocidade, frequência e deformação da rampa ascendente de temperatura. Atingindo os 20 °C e após um curto tempo de equilíbrio (15 min) fez-se um varrimento em frequência de 0.05 a 50 rad/s e, por fim, um ensaio de varrimento em deformação.

Para os ensaios isotérmicos, utilizou-se como sistema de medida um cone em aço inoxidável de diâmetro 40 mm e ângulo 4°. As amostras foram colocadas na placa inferior a uma temperatura de 40 °C e, após baixar o cone, a temperatura foi rapidamente elevada

até 80 °C. A evolução dos módulos viscoelásticos foi registada durante 3 h, nas mesmas condições de frequência de oscilação e de amplitude de deformação usadas nos ensaios não isotérmicos. Imediatamente a seguir, efetuou-se um varrimento em frequência a 80 °C na gama de frequências 0.05-50 rad/s.

Em todos os ensaios efetuados, quer isotérmicos quer não isotérmicos, a superfície da amostra exposta foi coberta por uma fina camada de óleo mineral de baixa viscosidade, a fim de evitar qualquer evaporação de solvente. Todos os ensaios foram realizados, no mínimo, em triplicado.

3.2.6 Microscopia confocal de varrimento de laser

A microestrutura dos géis de IPS e das misturas IPS/GM a pH7 foi estudada recorrendo a microscopia confocal de varrimento de laser (CLSM).

Para a análise por CLSM adicionou-se às soluções das amostras a estudar (preparadas como descrito em § 3.2.3) rodamina B (0.054 % por ml de amostra a corar) com o objetivo de “marcar” as proteínas.

Nas misturas em que se pretendeu corar ambos os biopolímeros foi necessário corar as GM previamente à sua mistura com o IPS. A marcação do polissacarídeo foi efetuada com o fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) por ligação covalente seguindo o procedimento descrito por Belder e Granath (1973) e Tromp *et al.* (2001) com algumas alterações: misturou-se 0.75 g de GM com 105 mg de FITC, 300 µL de piridina e 60 µL de dibutil dilaurato de estanho em 75 mL de dimetilsulfóxido. Aqueceu-se esta mistura, sob agitação lenta, a 95 °C por 2 h e de seguida precipitou-se o polissacarídeo em 300 mL de etanol. Centrifugou-se a 9600 g durante 410 min a 20 °C. Recolheu-se o polissacarídeo e redissolveu-se em 150 mL de água quente. Congelou-se em azoto líquido e liofilizou-se. A amostra de GM obtida foi pulverizada e guardada em exsiccador. A preparação das soluções de GM coradas seguiu o procedimento descrito em § 3.2.3.1.

Previamente à análise microscópica, cada mistura a testar foi colocada, à temperatura ambiente, numa lâmina escavada e tapada com uma lamela. De seguida, este conjunto foi colocado na placa inferior do reómetro a 40 °C e submeteram-se as amostras a ensaios não

isotérmicos num reômetro TA AR-1000. As condições do ensaio foram equivalentes às descritas em § 3.2.5.2.2.

As lâminas foram analisadas num microscópio *LSM 510 META* equipado com lasers emitindo radiação de comprimento de onda de 488 nm e 561 nm, para os marcadores de fluorescência FITC e Rodamina B, respetivamente. O sinal de fluorescência foi recolhido num “*spectral gate*” de 530-630 nm e processado com o *software Zeiss LSM 510 4.0*.

3.3. Resultados e Discussão

3.3.1 Purificação das galactomananas

Os rendimentos de purificação foram cerca de 84 %, 70 % e 73 % para as gomas purificadas de alfarroba, guar e de tara, respetivamente, em relação às gomas comerciais. O processo de purificação permitiu obter amostras mais solúveis, sendo as soluções aquosas resultantes mais claras e estáveis do que as obtidas com as gomas comerciais.

Na Tabela 3.2 são apresentados os teores médios de humidade, cinzas e proteína das gomas comerciais e purificadas de GA, GG e GT.

Constatou-se que o teor de proteína e cinzas de todas as amostras estudadas diminuiu devido ao processo de purificação utilizado, à semelhança do verificado em trabalhos anteriores (Lopes da Silva e Gonçalves, 1990).

Tabela 3.2 – Teores médios de humidade, cinzas e proteína para as amostras comerciais e purificadas das gomas de alfarroba, guar e tara.

<i>Amostra</i>		<i>Humidade</i>	<i>Cinzas</i>	<i>Proteína</i>
Alfarroba	GAcom	9.52 ± 0.08	0.91 ± 0.01	7.21 ± 0.19
	GApur	10.39 ± 0.12	0.25 ± 0.03	1.67 ± 0.06
Guar	GGcom	8.53 ± 0.15	1.02 ± 0.06	4.35 ± 0.12
	GGpur	7.82 ± 0.09	0.39 ± 0.02	1.14 ± 0.10
Tara	GTcom	10.16 ± 0.21	1.75 ± 0.07	6.56 ± 0.09
	GTpur	11.43 ± 0.06	0.72 ± 0.04	1.39 ± 0.13

A presença de proteínas nas farinhas comerciais pode ter origem em algumas enzimas ou em contaminação proveniente do gérmen. O processo de dissolução em água, seguido de centrifugação, e a precipitação em etanol, realizados durante a purificação das farinhas comerciais, são bastante eficazes e permitem garantir a remoção de grande parte do material de natureza proteica e de natureza inorgânica.

O aumento de humidade nas amostras de GA e GT purificadas reflete, provavelmente, um défice de secagem das amostras.

3.3.2 Seleção das amostras de galactomananas modificadas

De forma a seleccionar as amostras de GA para o trabalho a seguir descrito, determinou-se a massa molecular e a razão manose/galactose das amostras de GA tratadas com β -mananase por diferentes tempos de hidrólise. A Figura 3.5 apresenta a variação da massa molecular média (M_w) e do grau de ramificação (razão manose/galactose, man/gal) em função do tempo de hidrólise.

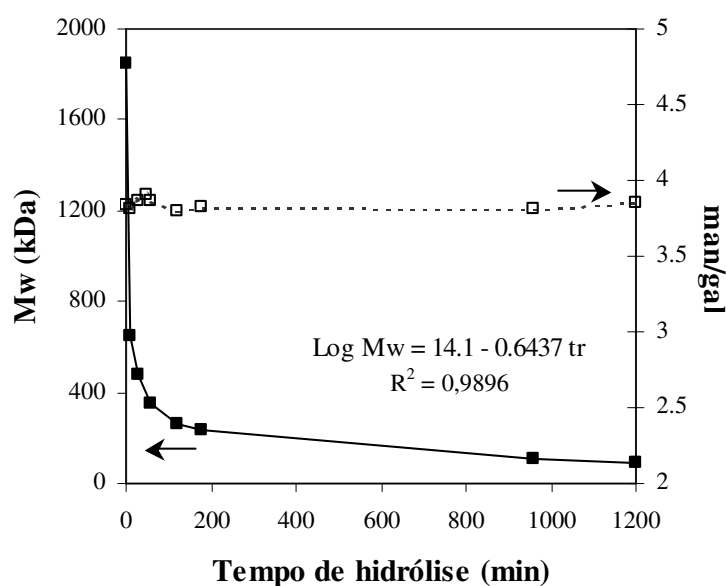


Figura 3.5 – Variação da massa molecular (M_w) (■) e da razão manose/galactose (□) das amostras de GA em função do tempo de hidrólise (tr) com β -mananase. A equação apresentada corresponde à curva de calibração obtida a partir da análise com padrões de pululanos comerciais

Como esperado, a massa molecular diminui com o aumento do tempo de hidrólise, o que reflete a ação degradativa da endo- β -mananase. De acordo com o descrito por Tayal *et al.* (1999), constata-se que a redução da massa molecular é mais intensa para os primeiros tempos de incubação, diminuindo a taxa de hidrólise à medida que aumenta o tempo de exposição à enzima: a massa molecular passa de 2060 kDa para 799 kDa em apenas 10 min, o que corresponde a um decréscimo em cerca de 60 % da massa molecular. Durante a reação de despolimerização da GA, o grau de ramificação (man/gal) permaneceu praticamente inalterado, sugerindo que as ligações α -1,6 entre as unidades de manose e as cadeias laterais de galactose não foram significativamente afetadas.

A amostra de GA purificada, submetida às mesmas condições das amostras despolimerizadas, e as amostras obtidas após 10, 30, 180 e 1200 min de reação enzimática foram selecionadas para avaliar o efeito da massa molecular na gelificação dos isolados proteicos de soja, designando-se as amostras de polissacarídeo por GA 0, GA 1, GA 2, GA 3 e GA 4, respetivamente. Para avaliar o efeito do grau de ramificação na gelificação dos isolados proteicos de soja foram utilizadas as amostras purificadas de GA, GG e GT. Neste sentido, apenas se apresenta a caracterização físico-química e reológica das amostras de polissacarídeo que foram utilizadas para avaliação dos efeitos estruturais das galactomananas na capacidade gelificante dos IPS.

3.3.3 Caracterização físico-química dos polissacarídeos selecionados

3.3.3.1 Razão manose/galactose

Todas as amostras foram analisadas quanto ao conteúdo em açúcares neutros pelo método descrito na seção 3.2.4.4. Dado que se tratam de GM a sua composição consiste essencialmente em manose e galactose, variando entre amostras, a proporção entre estes dois monómeros. Verificou-se ainda a presença de alguns vestígios de outros açúcares (glucose, por exemplo), embora em quantidades próximas do limite de deteção do próprio método.

Neste trabalho não são apresentados os valores efetivos das quantidades de açúcares neutros obtidas para cada uma das amostras, mas sim as razões man/gal uma vez que foi o

efeito deste fator que se pretendeu avaliar na capacidade gelificante de IPS. A Tabela 3.3 resume algumas das características das amostras de GM selecionadas.

De entre as gomas a que possui menor man/gal é a de guar (≈ 1.5) e a goma de alfarroba é a que possui maior razão man/gal (≈ 3.8). Estes valores de razão man/gal são concordantes com a gama de valores descritos na literatura (Daas *et al.*, 2000; Lazaridou *et al.*, 2000).

Quanto às frações obtidas por tratamento enzimático da GA purificada, as razões man/gal, tal como esperado, não sofreram alterações significativas, sugerindo que a enzima β -mananase não atuou nas ligações α -1,6 entre as unidades de manose e as cadeias laterais de galactose.

Tabela 3.3 – Razões manose/galactose, massas moleculares, polidispersidade (Mw/Mn), viscosidade intrínseca $[\eta]$ e constantes de Huggins (K') das amostras de galactomananas

Amostra	man/gal	Mw (kDa)	Mw/Mn	$[\eta]$ (mL/g)	K'
GG	1.50 ± 0.08	1982 ± 112	1.19 ± 0.04	1620 ± 10	0.68 ± 0.09
GT	3.00 ± 0.27	2093 ± 50	1.06 ± 0.07	1460 ± 30	1.03 ± 0.14
GA0	3.84 ± 0.02	2060 ± 94	1.07 ± 0.09	1360 ± 27	0.56 ± 0.07
GA1	3.81 ± 0.02	799 ± 36	1.08 ± 0.03	710 ± 25	0.63 ± 0.03
GA2	3.86 ± 0.03	630 ± 15	1.12 ± 0.11	633 ± 12	0.53 ± 0.01
GA3	3.81 ± 0.02	319 ± 48	1.37 ± 0.13	500 ± 18	0.52 ± 0.06
GA4	3.83 ± 0.05	149 ± 22	1.42 ± 0.08	200 ± 13	0.49 ± 0.03

3.3.3.2 Massa molecular e viscosidade intrínseca

Os valores de massa molecular média das gomas em estudo foram obtidos de acordo com o descrito na seção 3.2.4.2 e estão apresentados na Tabela 3.3. As relações lineares entre η_{sp}/C e C (gráfico de Huggins) e entre $(\ln \eta_r)/C$ e C (gráfico de Kraemer) foram obtidas para as soluções aquosas de cada uma das amostras de GM em análise (Figura 3.6) e a viscosidade intrínseca foi calculada por aplicação das equações 3.2 e 3.3.

A viscosidade intrínseca é uma propriedade característica de macromoléculas isoladas em determinado solvente pois está relacionada com o volume hidrodinâmico ocupado pelo polímero, estando dependente da conformação da molécula e da massa molecular, assim como das propriedades do solvente em que se encontra (Lopes da Silva *et al.*, 2004). A viscosidade intrínseca das amostras em estudo variou entre 200 e 1620 mL/g, observando-se, como esperado, o seu decréscimo com a diminuição da massa molecular. Por outro lado, o coeficiente de Huggins (K'), medida das interações polímero-polímero em solução, determinado a partir do declive do gráfico $\eta_{sp}/C = f(C)$ (Figura 3.6), variou entre 0.42 e 0.76. Valores descritos na literatura situam-se, geralmente, entre 0.3 (para “bons” solvantes) e 1.0.

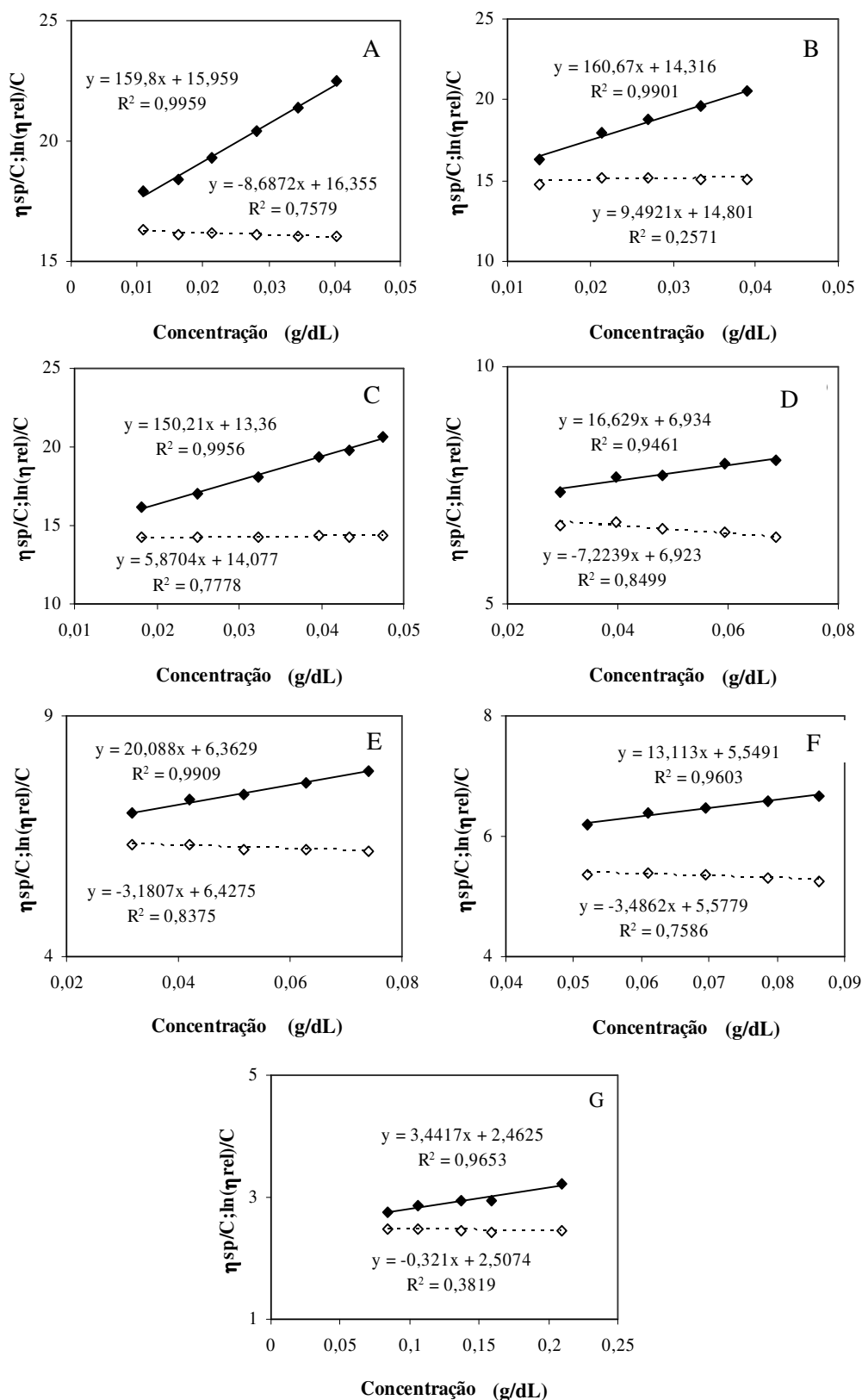


Figura 3.6 – Representação gráfica de Huggins (símbolos fechados) e de Kraemer (símbolos abertos) para determinação da viscosidade intrínseca das amostras: GG (A); GT (B); GA 0 (C); GA 1 (D); GA 2 (E); GA 3 (F) e GA 4 (G).

Os coeficientes de Huggins de todas as amostras de GM estudadas foram superiores ao valor normal para polímeros em bons solventes (0.3–0.4) (Cheng *et al.*, 2002). Isto indica a existência de interações polímero-polímero entre as moléculas das gomas, sugerindo uma provável formação de ligações inter e intramoleculares nas regiões não substituídas da cadeia principal das GM, as quais tenderam a diminuir por efeito da ação enzimática da β -mananase, resultando na diminuição do coeficiente de Huggins para as amostras hidrolisadas.

Os valores de massa molecular das três GM, GG, GT e GA, não diferiram muito entre si. Contudo, a viscosidade intrínseca das três gomas é bastante diferente revelando o efeito do grau de ramificação: A diminuição do grau de ramificação (aumento da razão man/gal) levou a uma diminuição da viscosidade intrínseca. Isto sugere, atendendo a que não existe alteração significativa da massa molecular da GM, que o volume hidrodinâmico ocupado pelo biopolímero diminuiu com a diminuição do grau de ramificação. O aumento do tempo de exposição à ação degradativa da enzima β -mananase resultou, tal como seria de esperar, na diminuição significativa da massa molecular, acompanhada por diminuição da viscosidade intrínseca. Contudo, o efeito do tratamento enzimático é mais acentuado nos valores de massa molecular do que na viscosidade intrínseca (Tabela 3.3). Isto sugere que o tratamento enzimático contribuiu para a desagregação das GM, por diminuição do número e/ou tamanho dos agregados, os quais afetam intensamente a determinação da massa molecular e as propriedades reológicas das soluções do polissacarídeo e, em menor extensão, a viscosidade intrínseca, sugerindo que é menos afetada pela existência dos agregados, normalmente compactos (pseudo-esféricos) das GM (Picout *et al.*, 2001; Picout *et al.*, 2002).

A relação entre a massa molecular e a viscosidade intrínseca para as amostras de GA tratadas com β -mananase é apresentada na Figura 3.7, na forma de representação gráfica de Mark-Houwink-Sakurada (MHS).

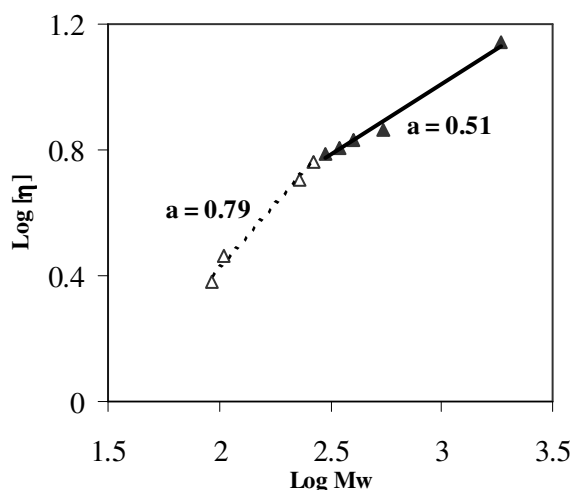


Figura 3.7 – Representação gráfica de Mark-Houwink para as frações de GA obtidas por hidrólise enzimática controlada.

A relação de potência entre viscosidade intrínseca e a massa molecular média, Equação de Mark-Houwink-Sakurada (Equação 3.6), reveste-se de particular importância fundamental e aplicada, permitindo inferir se a despolimerização enzimática afetou o grau de agregação/compatação do polissacarídeo.

$$[\eta] = KM^a \quad (3.6)$$

onde K e a são constantes a determinada temperatura e para determinado sistema, estando relacionadas com a conformação da macromolécula.

Os valores determinados para a constante de MHS (constante a) encontram-se no intervalo entre 0.8 (limite de exclusão de volume) e 0.5 (condições teta, condições não perturbadas) (Picout *et al.*, 2001).

Analisando a Figura 3.6 constata-se que as frações com massa molecular superior, apresentam valores de constante a menores ($a = 0.51$) do que as amostras com menores massas moleculares ($a = 0.71$), o que sugere que as amostras de GA com massa molecular superior a 35.5×10^4 Da possuem uma estrutura ligeiramente mais compacta resultante, possivelmente, de uma agregação mais intensa entre as moléculas de polissacarídeo do que as frações com massa molecular inferior ao referido valor. Com a ação da enzima β -mananase, obtêm-se fragmentos sucessivamente mais pequenos, nos quais o número de resíduos de manose suscetíveis de estabelecerem ligações decresce progressivamente com a ação enzimática, o que diminui a tendência para a ocorrência de agregação entre

fragmentos. Trabalhos reportados na literatura corroboram o aumento da constante de MHS com a diminuição da massa molecular do polissacarídeo (Wang *et al.*, 2001).

3.3.4 Caracterização reológica dos polissacarídeos selecionados

3.3.4.1 Ensaios de escoamento

As soluções diluídas de polissacarídeos exibem normalmente um comportamento newtoniano, mas quando a concentração destes biopolímeros aumenta o seu comportamento reológico desvia-se do comportamento de um fluído ideal para apresentar um comportamento reofluidificante, em que a viscosidade diminui com o aumento da taxa de deformação.

Realizaram-se ensaios de escoamento para várias soluções das GM em estudo, com concentrações a variar entre 0.2 e 1 g/dL. Como exemplo, na Figura 3.8 comparam-se as diferentes amostras de GM para dois valores de concentração 0.2 e 0.7 g/dL.

Para o valor mais baixo de concentração, verificou-se que todas as amostras apresentam um comportamento próximo do comportamento de um fluído newtoniano, em que a viscosidade aparente praticamente não varia com a taxa de deformação. Por outro lado, o aumento da concentração, para todas as amostras não submetidas a tratamento enzimático, tornou evidente o caráter reofluidificante: Para baixas taxas de deformação é possível observar o *plateau* newtoniano, correspondente a uma viscosidade praticamente constante (η_0 , viscosidade a taxa de deformação nula) e, com o aumento da taxa de deformação imposta ao sistema, verifica-se um decréscimo na viscosidade. Este comportamento é, normalmente, observado para soluções de galactomananas para regime concentrado, podendo ser explicado com base no conceito de entrelaçamento macromolecular e no seu progressivo rompimento e alinhamento das macromoléculas no sentido do escoamento à medida que aumenta a taxa de deformação a que a amostra está sujeita.

O efeito da massa molecular na viscosidade aparente é mais sentida à concentração mais elevada pois observa-se uma alteração drástica de comportamento do polímero em solução em função da sua massa molecular: a amostra GA 0, de maior massa molecular, (Figura 3.8 C) apresenta um comportamento tipicamente reofluidificante, mas com o decréscimo da massa molecular observa-se um comportamento sucessivamente mais próximo do

newtoniano, com valores de viscosidade cada vez mais constantes e independentes da taxa de deformação imposta. Por outro lado, embora o perfil de evolução da viscosidade com a taxa de deformação seja semelhante, as soluções das amostras de GA hidrolisada apresentam valores distintos de viscosidade aparente: Quanto maior o tempo de hidrólise, menor a viscosidade aparente. A clivagem das ligações β -1,4 do esqueleto principal da GA reduz significativamente a viscosidade aparente das soluções da GA: Após 1200 min de degradação enzimática ocorre uma redução da viscosidade aparente, em cerca de duas ordens de magnitude.

Verificou-se ainda que a viscosidade aparente das soluções de GM variou consoante a razão man/gal. A GG tendo uma menor razão man/gal (maior grau de ramificação) foi a GM que apresentou carácter reofluidificante mais acentuado e viscosidade aparente a taxa de deformação nula (η_0) maior. O aumento da razão man/gal das amostras de GM traduziu-se na diminuição da viscosidade aparente.

Desta forma, os ensaios de escoamento das várias amostras confirmaram as conclusões obtidas a partir dos resultados de viscosidades intrínsecas.

No que respeita ao início do comportamento reofluidificante verificou-se que este correspondia a uma taxa de deformação menor para as amostras de GG (menor razão man/gal) e tinha início para taxas de deformação superiores para as amostras de GA (maior razão man/gal). Para além disso, a viscosidade das amostras da GG apresentou uma dependência da taxa de deformação maior do que a das restantes gomas, evidenciado pelos declives das curvas da Figura 3.8.

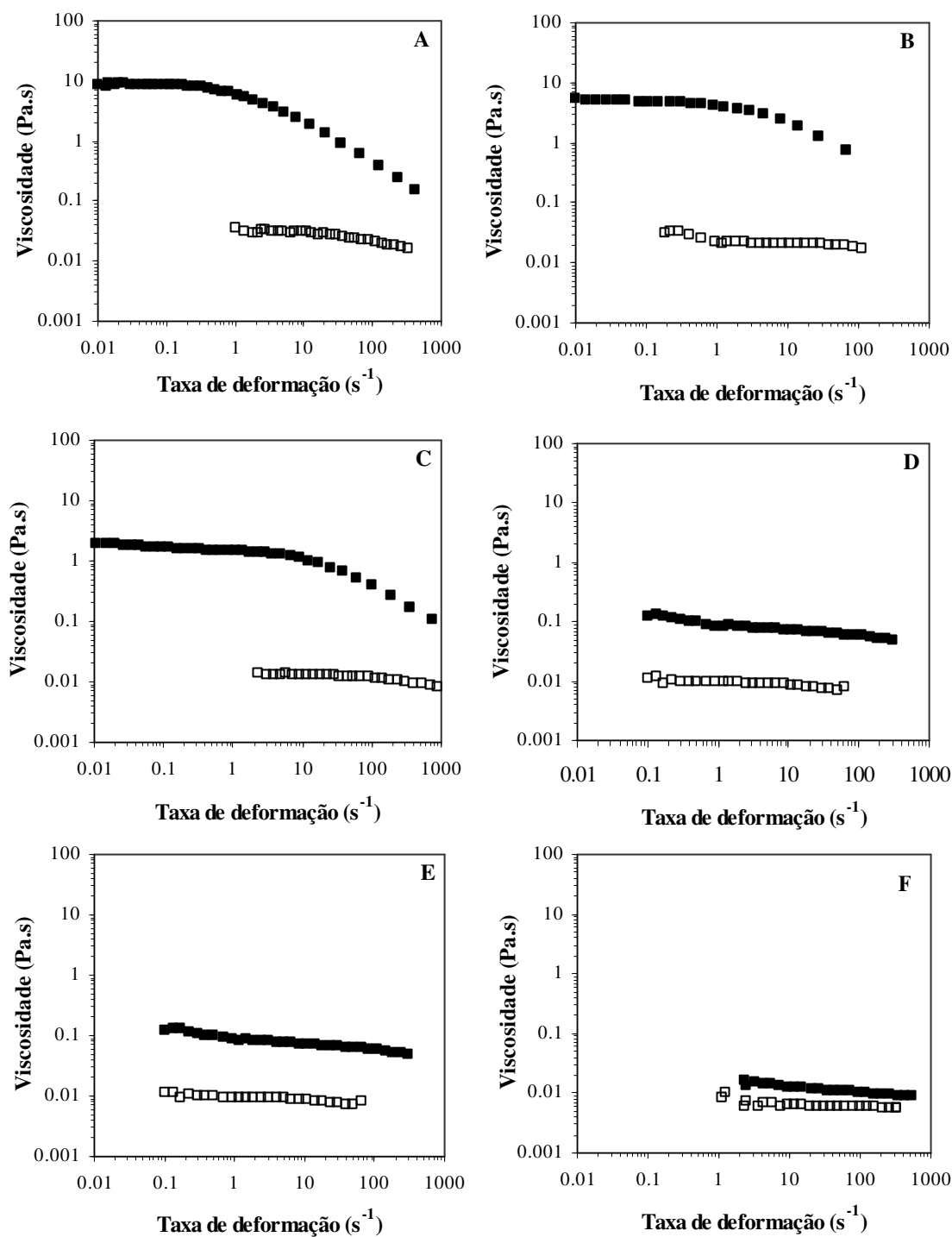


Figura 3.8 – Curvas de escoamento (viscosidade aparente em função da taxa de deformação) para as soluções das amostras de (A) GG; (B) GT; (C) GA0; (D) GA1; (E) GA3 e (F) GA4, para as duas concentrações de GM estudadas: 0.2 g/dL (símbolos abertos) e 0.7 g/dL (símbolos fechados)

Para as diferentes amostras e concentrações ensaiadas, determinaram-se os valores de viscosidade a taxa de deformação nula (η_0) e, a partir destes, os correspondentes valores de

viscosidade específica ($\eta_{sp} = (\eta_0 - \eta_s) / \eta_s$). Os valores de η_0 foram obtidos por aplicação do modelo de Cross (Equação 3.4) a cada uma das curvas de escoamento obtidas para as várias concentrações testadas. A Figura 3.9 apresenta um exemplo do bom ajuste aos dados experimentais obtido com este modelo.

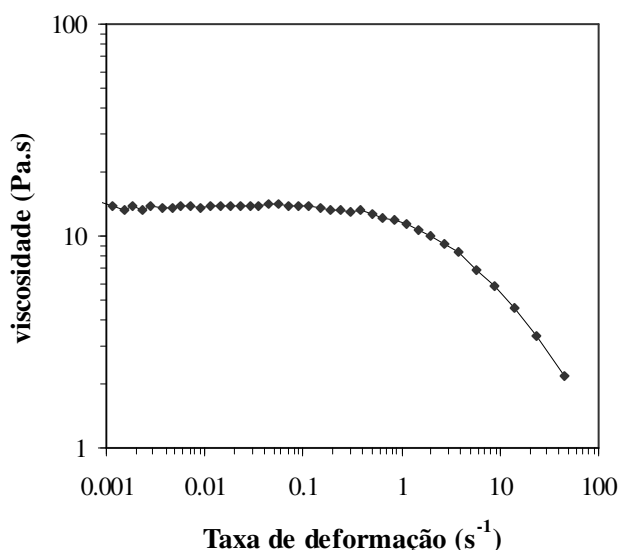


Figura 3.9 – Aplicação do modelo de Cross (linha a cheio) aos dados de viscosidade aparente *versus* taxa de deformação para uma solução da GA0 1g/dL

Apesar das diferenças observadas entre as amostras em estudo, quer seja para os valores de viscosidade quer seja para o início do caráter reofluidificante, a dependência da viscosidade específica face ao parâmetro de interpenetração molecular ($C[\eta]$) das amostras de GM analisadas segue o comportamento generalizado observado para este tipo de polissacarídeos (Morris *et al.*, 1981). Na Figura 3.10 representou-se o logaritmo da viscosidade específica ($\log \eta_{sp}$) em função do produto da concentração da GM pela viscosidade intrínseca ($\log C[\eta]$) e constatou-se que as amostras com diferente razão man/gal e com massa molecular a variar entre 2060 e 319 kDa apresentaram um comportamento semelhante, não sendo possível distinguir, de forma bem evidente, o efeito do grau de ramificação, origem ou massa molecular destes polissacarídeos.

A amostra GA4 afastou-se ligeiramente deste comportamento, exibindo declives, quer para o regime diluído quer concentrado, ligeiramente diferentes dos apresentados pelas restantes GM em estudo. Porém, os valores de declive determinados para esta amostra enquadram-se no intervalo definido na literatura (Lopes da Silva *et al.*, 2004) para polissacarídeos com

conformação desordenada em solução que interagem por interpenetração física topológica (Lapasin e Prich, 1999; Lazaridou *et al.*, 2003).

Funami *et al.* (2005) também reportaram uma ligeira diferença de declive para amostras de GG de baixa massa molecular.

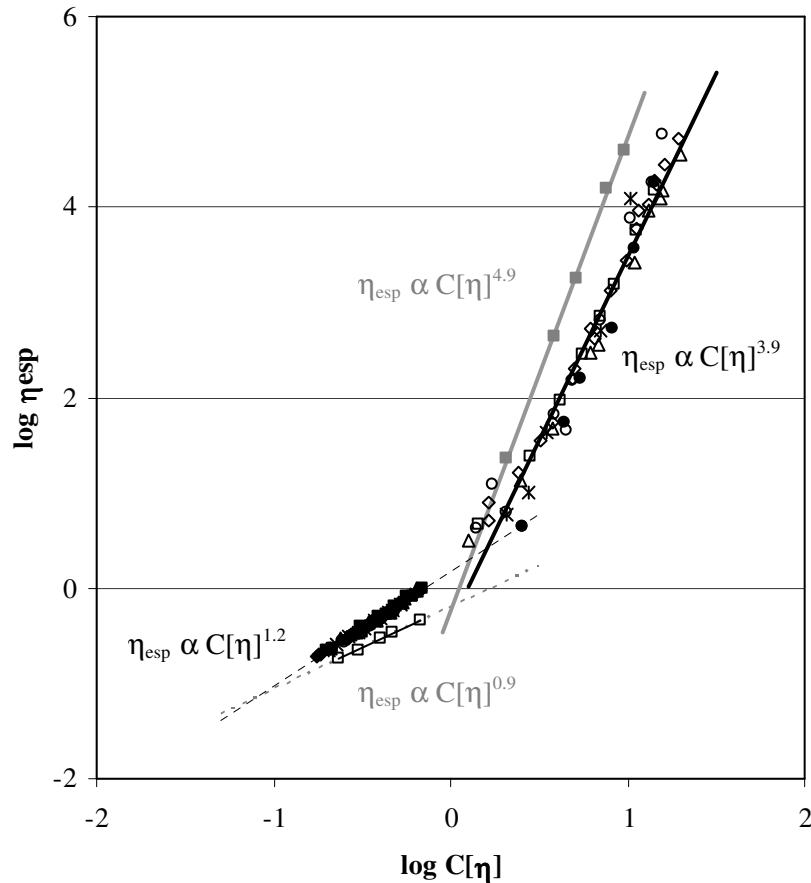


Figura 3.10 – Curva mestra ($\log C[\eta]$ em função de $\log \eta_{sp}$) para as várias amostras de GM.

(○)-GA0; (△)-GA1; (□)-GA2; (◇)-GA3; (*)-GT; (-). GG. Símbolos a cinza correspondem à amostra GA4.

Analisando a Figura 3.10 é possível verificar a influência da concentração e do volume hidrodinâmico do polissacarídeo na viscosidade das suas soluções aquosas. Os declives das curvas mostram que para soluções diluídas a dependência da viscosidade face à concentração do polímero é muito inferior à verificada para soluções concentradas: variando entre 0.9 e 1.2 no primeiro caso e 3.9 e 4.9 no segundo. Estes valores determinados estão de acordo com os valores de declive das curvas para diversos biopolímeros, intervalo de 1.1 e 1.4 para o regime diluído e 3.3 e 5.1 para o regime concentrado (Lapasin e Prich, 1999). De acordo com Morris *et al.* (2004) para o regime

concentrado verifica-se ainda que os declives assumem valores distintos em função da respetiva conformação: biopolímeros relativamente flexíveis e desordenados apresentam valores de declive próximos de 3.3 ao passo que biopolímeros com conformações mais rígidas é usual observar-se um maior efeito da concentração (maior declive) e/ou interpenetração molecular. Desta forma, o valor de declive da amostra GA 4 poderá ser indicativo da maior rigidez desta amostra em virtude do menor tamanho das suas cadeias resultantes do maior tempo de hidrólise enzimática.

A transição entre o regime diluído, onde as moléculas individuais do biopolímero estão presentes como moléculas isoladas e o regime concentrado, onde o volume hidrodinâmico total das cadeias individuais do biopolímero excede o volume da solução, não corresponde a uma concentração bem definida mas a uma zona denominada regime semidiluído. Para concentrações abaixo desta zona a viscosidade depende essencialmente do volume hidrodinâmico ocupado por cada macromolécula, volume este que depende da massa molecular e da conformação desta. Para concentrações elevadas o efeito da interpenetração entre as moléculas de polímero passa a predominar.

Assim, a concentração crítica (C^*) marca o ponto onde as moléculas individuais do polissacarídeo começam a interpenetrar, começando a registar-se uma sobreposição e interpenetração macromolecular significativa. Para as amostras GM analisadas, C^* varia entre 0.10 e 0.60 g/dL. A concentração crítica está inversamente relacionada com o volume ocupado por cada cadeia macromolecular e varia com o tamanho da molécula, o que sugere que as diferenças encontradas de C^* , para as várias amostras analisadas, resultam essencialmente da variação do tamanho molecular das diferentes frações.

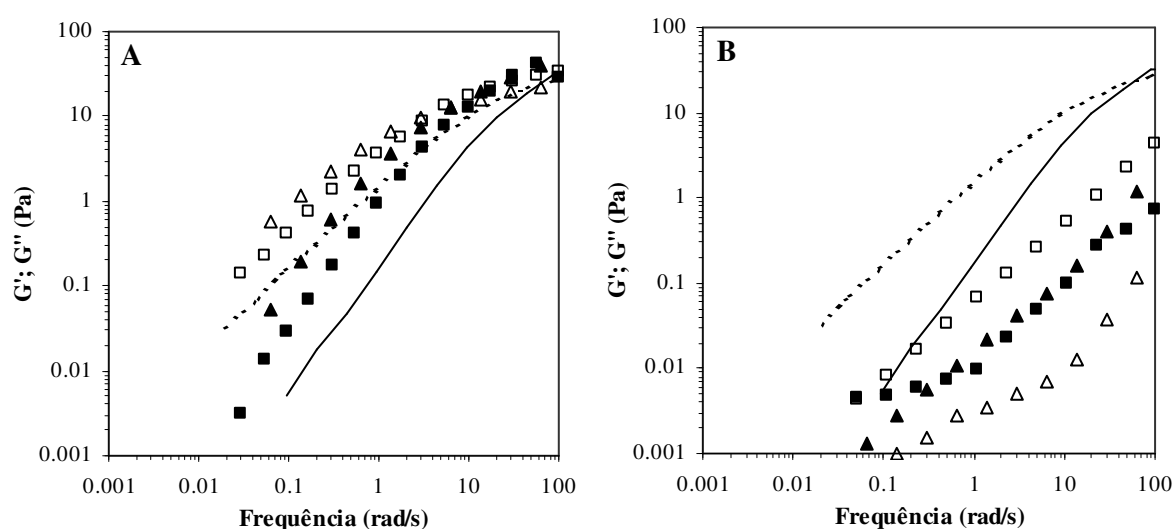
De acordo com o esperado, verifica-se uma tendência progressiva para o aumento da concentração crítica com a diminuição da massa molecular do polissacarídeo, o que permite inferir que quanto maior a massa molecular da amostra, menor a concentração para a qual se observam os efeitos de viscosidade/espessamento. Por outro lado, o efeito do grau de ramificação não resultou numa variação significativa do valor de C^* .

O aumento da C^* com a diminuição da massa molecular do polissacarídeo foi também reportada por Lazaridou *et al.* (2003) e Funami *et al.* (2005).

3.3.4.2 Ensaios de oscilação

Os ensaios reológicos em regime oscilatório são métodos dinâmicos que quando realizados a baixa amplitude de deformação são particularmente úteis para avaliação da organização macromolecular, incluindo aspetos conformacionais e interações intermoleculares.

Foram obtidos espectros mecânicos (módulos viscoelásticos em função da frequência de oscilação) para as várias amostras em estudo e diferentes concentrações. Na Figura 3.11 apresentam-se os espectros mecânicos obtidos para uma concentração de GM de 0.7 g/dL.



(—; ----) GA0; (A) (■,□) GT e (▲,△) GG; (B) (■,□) GA1 e (▲,△) GA4

Figura 3.11 – Espectros mecânicos das amostras de GM, 0.7 g/dL a 25 °C (G' símbolos fechados e linha a cheio; G'' símbolos abertos e linha tracejada)

Estes espectros mecânicos são típicos do comportamento viscoelástico observado para biopolímeros com as características das GM. Observa-se uma grande dependência dos módulos viscoelásticos face à variação da frequência de oscilação. Verifica-se também que para frequências baixas, em que o comportamento viscoelástico é controlado pelo movimento translacional das moléculas, o módulo de perda é superior ao módulo de armazenamento e à medida que a frequência aumenta, o valor de G' aproxima-se de G'' acabando, eventualmente, por se cruzar (amostras de GM não tratadas enzimaticamente) numa zona de frequência em que o intervalo de tempo correspondente a um período de

oscilação não é suficientemente largo para permitir o rompimento do entrelaçamento macromolecular o que se traduz no armazenamento de mais energia elástica.

A hidrólise enzimática da GA com β -mananase levou à diminuição do valor dos módulos viscoelásticos e G'' manteve-se sempre superior a G' em toda a gama de frequências analisada. Comparando as amostras de diferentes origens constatou-se que a goma mais ramificada (GG) apresentou módulos viscoelásticos mais elevados e o cruzamento destes ocorreu a frequências mais baixas. A GA (menos ramificada) situou-se no extremo oposto.

3.3.5 Gelificação do IPS

Embora a influência da concentração, pH, taxa de aquecimento e temperatura máxima de aquecimento na gelificação das proteínas de soja esteja reportada na bibliografia por alguns investigadores (Puppo *et al.*, 1995; Renkema *et al.*, 2002; Renkema e van Vliet, 2002; Zhu *et al.*, 2008), é importante realçar que o IPS utilizado neste trabalho foi extraído laboratorialmente e, sabendo que a origem dos grãos de soja pode introduzir alterações a nível quantitativo das subunidades constituintes do isolado, tornou-se fundamental efetuar um breve estudo sobre o efeito dos parâmetros anteriormente referidos na capacidade gelificante do isolado utilizado.

De forma a determinar as condições experimentais a utilizar nos ensaios reológicos para o estudo da gelificação dos sistemas IPS e IPS/GM, começou por se realizar varrimentos em temperatura, onde se variou a temperatura máxima de aquecimento, taxa de aquecimento e concentração do isolado de soja.

Os ensaios foram realizados a 40 °C até uma temperatura máxima variável, registando-se a evolução dos módulos viscoelásticos em função da temperatura, a uma frequência de oscilação de 5 rad/s e 1 % de deformação. O valor da deformação foi selecionado com base em resultados de ensaios de varrimento em deformação que permitiram identificar a zona de comportamento viscoelástico linear. No final da rampa ascendente de temperatura, manteve-se a temperatura a 95 °C durante 10 min e de seguida fez-se descer a temperatura até 20 °C nas mesmas condições de velocidade, frequência e deformação da rampa ascendente de temperatura. Atingindo os 20 °C fez-se um varrimento em frequência de 0.05 a 50 rad/s.

3.3.5.1 Efeito da temperatura máxima e da taxa de aquecimento

Para se analisar a influência da temperatura máxima (T_{max}) e da taxa de aquecimento (α) na gelificação do IPS a uma concentração de 10 %, realizaram-se ensaios de varrimento em temperatura de acordo com a seção § 3.2.5.2.2, onde a T_{max} variou entre 65 ° e 95 °C, a uma taxa de 1°C/min, no primeiro caso e a taxa de aquecimento variou entre 0.1 °C/min e 3 °C/min, até uma temperatura máxima de 95 °C, no segundo. De forma a avaliar o efeito dos parâmetros pretendidos, representou-se o tempo ao fim do qual o módulo de armazenamento igualou o módulo de perda ($t_{G'=G''}$), considerado neste caso como tempo de gelificação, e o valor de G' obtido a partir do espectro mecânico, à frequência de 1 rad/s [$G'(\omega=1 \text{ rad/s})$] em função da variação da T_{max} (Figura 3.12 A). Analisou-se ainda a variação da temperatura de gelificação (T_{gel}), correspondente ao momento em que $G'=G''$, e o valor de G' [$G'(\omega=1 \text{ rad/s})$], obtido no varrimento em frequência, em função da variação da taxa de aquecimento (Figura 3.12 B).

Os resultados obtidos mostraram que o aumento da temperatura máxima de aquecimento promoveu uma diminuição do tempo ao fim do qual ocorreu cruzamento entre G' e G'' ($t_{G'=G''}$) e o aumento do módulo de armazenamento do gel final (Fig. 3.12 A). Observou-se que à temperatura de 65 °C não foi atingido o ponto de gelificação o que é facilmente explicado tendo em conta as temperaturas de desnaturação das duas principais globulinas constituintes do IPS analisado, 72 °C e 88 °C, respetivamente para a β -conglucina e glicina (resultados apresentados no capítulo 2).

Além disso, os resultados corroboram a ideia de que a desnaturação proteica é um pré-requisito para a gelificação. Para valores superiores a 70 °C, constatou-se que o aumento da temperatura máxima de aquecimento promoveu uma diminuição do tempo de gelificação e o aumento da rigidez do gel final. O aumento da temperatura de aquecimento, para além de aumentar a entropia e a proximidade entre as moléculas proteicas permite que maior quantidade de proteína desnature, promovendo a exposição dos grupos proteicos funcionais e, consequentemente, o estabelecimento de um maior número de ligações de modo a formar a rede tridimensional. Por outro lado, o aumento da rigidez dos géis obtidos resulta de uma maior quantidade de proteína incorporada na rede tridimensional resultante da maior desnaturação proteica promovida pelo aumento da temperatura.

O efeito da taxa de aquecimento na gelificação do IPS foi também avaliado (Figura 3.12 B) e corroboram os resultados de Renkema e van Vliet (2002). A taxas de aquecimento mais elevadas a gelificação inicia-se a temperaturas mais elevadas, obtendo-se géis menos rígidos e elásticos após arrefecimento. De acordo com Nagano *et al.* (1992) as temperaturas de desnaturação aumentam com o aumento da taxa de aquecimento, o que desencadeia um processo de gelificação mais lento e com menor quantidade de proteína incorporada na rede.

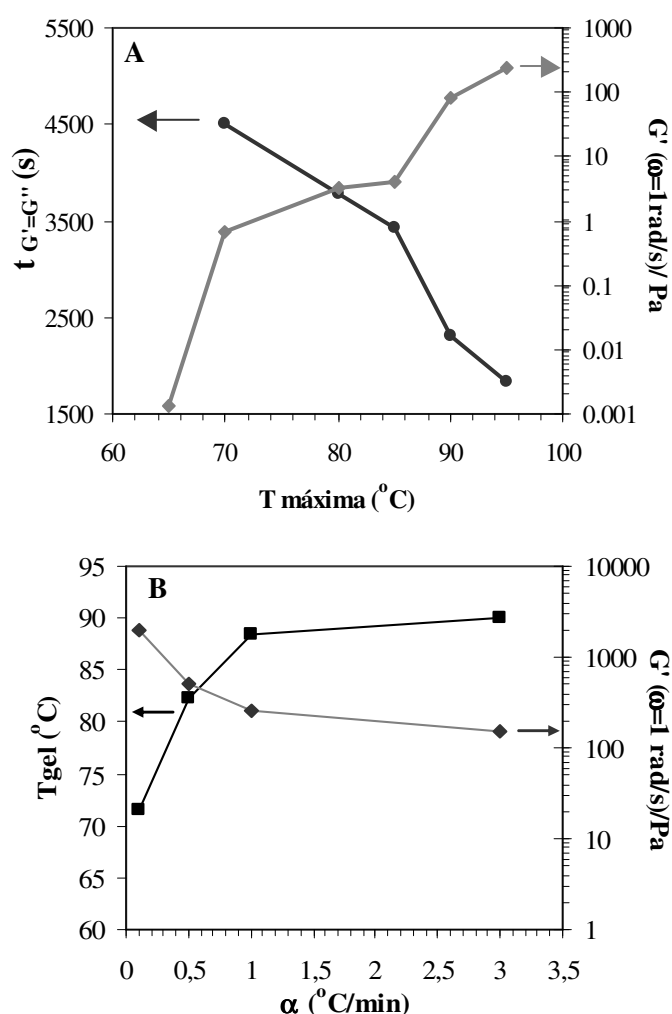


Figura 3.12 – Efeito da temperatura máxima (A) e da taxa de aquecimento (B) no módulo de armazenamento e no tempo e temperatura de gelificação de dispersões de IPS a 10%.

3.3.5.2 Efeito da concentração de IPS

A avaliação do efeito da concentração do isolado na capacidade gelificante das proteínas de soja foi realizada através da detecção empírica do ponto de gelificação por observação visual de dispersões de IPS a pH neutro, previamente aquecidas a 95 °C durante 10 min (equivalente ao descrito em § 3.2.5.2.2). O intervalo de concentrações de IPS estudado variou entre 4 e 16 % e na Figura 3.13 apresenta-se o diagrama de fases correspondente.

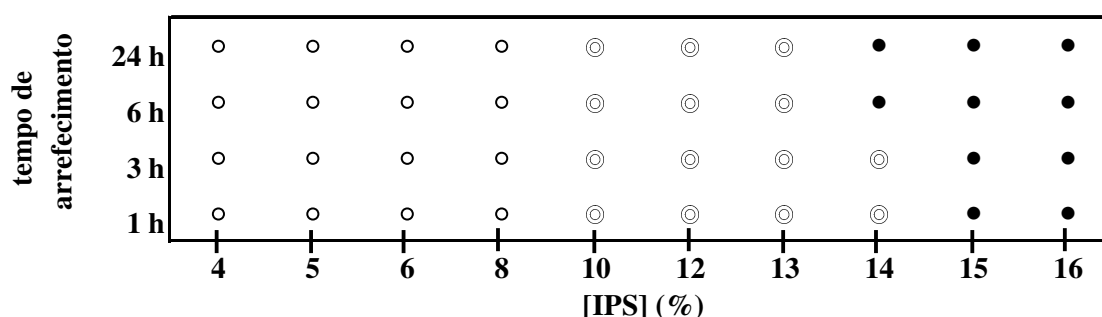


Figura 3.13 – Diagrama de fases de IPS com diferentes concentrações a diferentes tempos de arrefecimento. (•) – amostra não flui facilmente; (⊙) – amostra flui com agitação; (°) – amostra flui rapidamente

Ao inclinar cuidadosamente os tubos de ensaio constatou-se que, para as concentrações mais baixas de IPS, de 4 a 8 %, a amostra fluía rapidamente para os diferentes tempos de arrefecimento. O aumento da concentração para 10 % permitiu obter um sistema mais estruturado, mas que ainda se deformava e depois fluía com uma pequena agitação do tubo. De acordo com os critérios descritos por Renard e Lefebvre (1992), considerou-se que o último caso correspondia à transição sol-gel da amostra.

Os sistemas contendo 12 e 13 % de IPS tiveram um comportamento semelhante, onde a amostra fluía mas apenas após agitação e para todos os tempos de arrefecimento observados. Para as duas concentrações de IPS mais elevadas observou-se que a amostra não fluía facilmente denotando já a formação de um gel mais forte.

De seguida, investigou-se a evolução dos módulos viscoelásticos das dispersões de IPS, a pH neutro e a diferentes concentrações de proteína, em função da temperatura (40-95-20 °C) durante a formação do gel. Com base nos ensaios prévios acima descritos, seleccionou-se uma gama de concentrações entre 6 e 12 %.

O mecanismo de gelificação dos IPS está reportado na bibliografia (Renkema e van Vliet, 2002; Cavallieri *et al.*, 2010) e o perfil de variação dos módulos viscoelásticos do IPS analisado com a temperatura é similar ao descrito para outras proteínas globulares (Kavanagh *et al.*, 2000), incluindo as proteínas de soja e outras globulinas vegetais (Renkema e van Vliet, 2002; O’Kane *et al.*, 2004).

De um modo geral, com o aumento da temperatura, as proteínas que constituem o IPS são parcialmente desnaturadas, e alguns dos aminoácidos que, na estrutura nativa se encontram no interior da macromolécula, são agora expostos, podendo reagir e estabelecer ligações intermoleculares, dando origem à associação de moléculas e consequente formação de agregados. Neste trabalho, admitiu-se que o início da gelificação das proteínas constituintes do isolado correspondeu ao crescimento acentuado dos módulos viscoelásticos e a temperatura de gelificação à temperatura à qual G' assumiu um valor igual ou superior a G'' . Durante a fase de arrefecimento, ocorre um aumento da rigidez do sistema evidenciando o papel fundamental das ligações de hidrogénio na estrutura do gel.

O efeito das concentrações do IPS no tempo ao qual G' igualou G'' e no valor do módulo de armazenamento é apresentado na Figura 3.14.

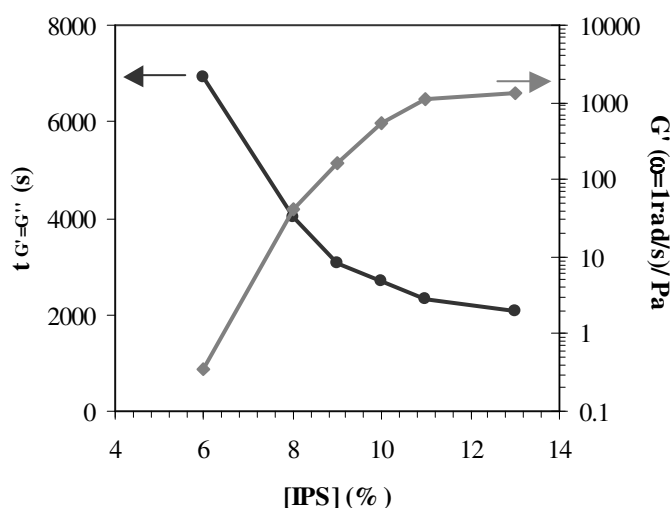


Figura 3.14 – Efeito da concentração proteica do IPS (6-13%) no tempo de gelificação e no valor do módulo de armazenamento.

Os resultados mostraram que o aumento da quantidade de proteína disponível permitiu obter uma rede mais estruturada e rígida, como se comprova pelo aumento dos valores de G' com o incremento da concentração atingindo-se o estado de gel mais rapidamente como

se verifica pelo decréscimo do tempo ao fim do qual $G'=G''$, nas condições de aquecimento estudadas (40-95-20 °C, $\alpha=1$ °C/min, $\omega=5$ rad/s).

Assim, foram selecionadas duas concentrações de IPS de modo a obterem-se dois tipos de sistemas proteicos que, por aquecimento, originassem propriedades macromoleculares significativamente diferentes: 6 % de IPS, correspondente a um sistema perto da transição sol-gel e 10 % de IPS, correspondente a um sistema que origina uma rede de gel mais definida e estruturada.

Para as duas concentrações selecionadas, a pH neutro, apresenta-se a evolução dos módulos viscoelásticos das dispersões de IPS em função da temperatura de acordo com o descrito em § 3.2.5.2.2 (Figura 3.15).

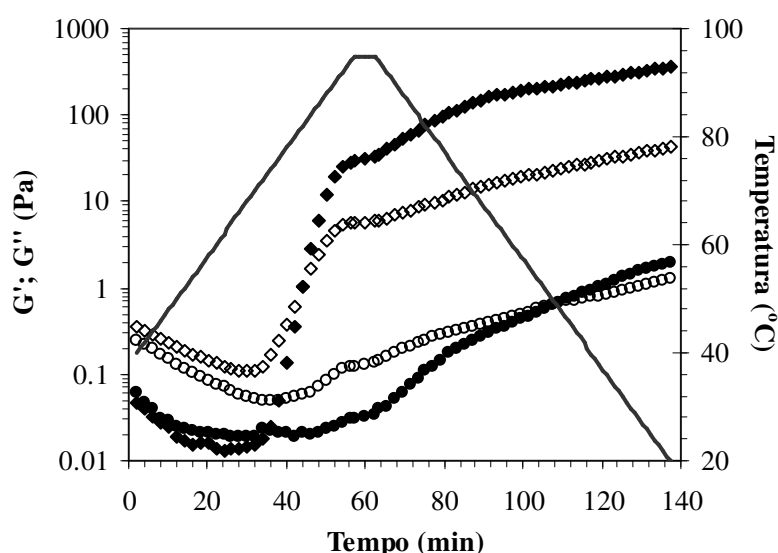


Figura 3.15– Dependência do módulo de armazenamento, G' (símbolos fechados) e do módulo de perda, G'' (símbolos abertos) com a temperatura, para os sistemas de IPS a 6 % (●,○) e 10 % (◆,◇) a pH 7. Ensaios realizados a uma taxa de variação de temperatura de 1 °C/min, a uma deformação de 0.4 % ou 1 % para sistemas contendo 6 % e 10 % de IPS, respetivamente, e uma frequência de 5 rad/s

Para ambas as concentrações de IPS estudadas observou-se um decréscimo do valor dos módulos viscoelásticos com o aumento da temperatura até aproximadamente 70 °C como resultado do efeito clássico da temperatura sobre as propriedades do biopolímero em solução. Por outro lado, embora G' e G'' apresentem, inicialmente, valores relativamente baixos sendo o módulo de armazenamento inferior ao de perda, não assumem valores próximos do ruído do equipamento, o que possivelmente resultará da existência de uma certa organização do sistema provavelmente como resultado da pré-agregação existente no

isolado. Esta observação poderá ser relacionada com os resultados de DSC descritos no Capítulo 2, onde se concluiu que no IPS 4 a fração β -conglícinina está desnaturada e possivelmente agregada.

A influência da concentração proteica foi notória, tanto na taxa de crescimento dos módulos viscoelásticos e consequentemente nos seus valores a 20 °C como no tempo ao fim do qual G' igualou G'' ($t_{G'=G''}$). Assim, verificou-se que um aumento da concentração da proteína levou a um aumento dos módulos viscoelásticos e a uma diminuição do tempo para o qual G' igualou G'' : para uma concentração de proteína de 6 % foi cerca de 109 min tendo diminuído para cerca de 44.1 min no caso de 10 % de proteína.

Em termos de temperatura de gelificação também se observaram diferenças: para a maior concentração proteica estudada, a gelificação ocorreu durante a rampa ascendente de temperatura, por volta dos 82 °C ao passo que para 6 % de proteína apenas se observou o cruzamento entre G' e G'' na fase de arrefecimento. Cavallieri *et al.* (2010) compararam a gelificação de proteínas de soja a 8 % e 10 % e também constatou que os sistemas com menor concentração proteica necessitaram de temperaturas mais elevadas para atingir o ponto de gelificação.

O aumento progressivo de G' após gelificação indica a progressiva incorporação de proteína na rede e, de acordo com Renkema e van Vliet (2002), a ocorrência de rearranjos no gel por fusão dos agregados proteicos, resultando num aumento da densidade e rigidez da estrutura.

Após arrefecimento até 20 °C, o comportamento viscoelástico dos géis formados foi analisado por ensaios oscilatórios de varrimentos em frequência (Figura 3.16). A análise destes espectros permitiu observar que a uma concentração proteica de 6 % o IPS apresentou um comportamento viscoelástico característico de um gel muito frágil, com um *plateau* elástico a baixas frequências, com G' superior a G'' , principalmente a baixas frequências e pequena dependência face à frequência. Porém observa-se para frequências mais elevadas um aumento significativo dos módulos viscoelásticos, a aproximação entre G' e G'' com um aumento de dependência relativamente à frequência de oscilação.

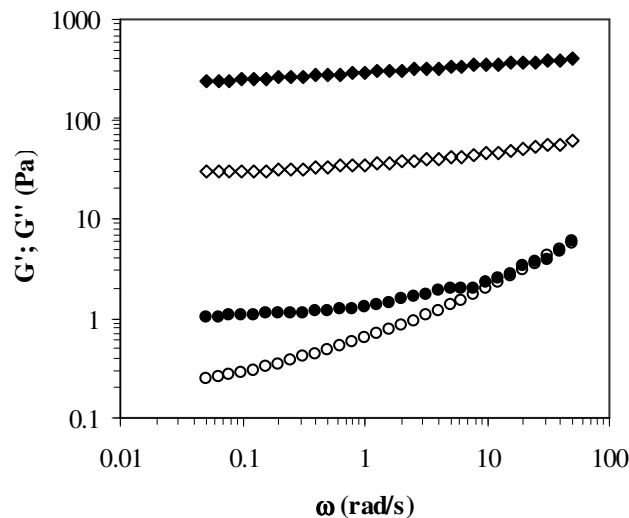


Figura 3.16 – Espetros mecânicos para sistemas de IPS a 6 % (●,○) e 10 % (◆,◇), a pH 7, obtidos a 20 °C após experiências não isotérmicas. Símbolos fechados correspondem a G' e símbolos abertos a G'' .

Para uma concentração de 10 % de IPS, observou-se um aumento dos módulos viscoelásticos, com G' sempre superior a G'' no intervalo de frequências testadas e com ambos os módulos praticamente independentes da frequência de oscilação, revelando que as interações intermoleculares que constituem a rede proteica são permanentes, sem grande probabilidade para a ocorrência de rearranjos na escala de tempo analisada.

Trabalhos anteriores reportam uma dependência das propriedades viscoelásticas relativamente à concentração de IPS semelhante à descrita, com uma concentração crítica de gelificação a variar entre 6 e 8 % quer para isolados comerciais quer para os obtidos laboratorialmente, dependendo do pH e força iónica (Sorgentini *et al.*, 1995; Hua *et al.*, 2005).

3.3.5.3 Identificação da zona de comportamento viscoelástico linear

Para se realizarem ensaios oscilatórios não-destrutivos, de forma a que a tensão aplicada nas amostras não afetasse a estrutura do material a analisar, foram efetuados ensaios preliminares de varrimento em tensão para determinar a região viscoelástica de comportamento linear dos sistemas em estudo.

A Figura 3.17 ilustra a dependência de G' com a deformação imposta após um varrimento em temperatura de sistemas de IPS a 6 % e a 10 %.

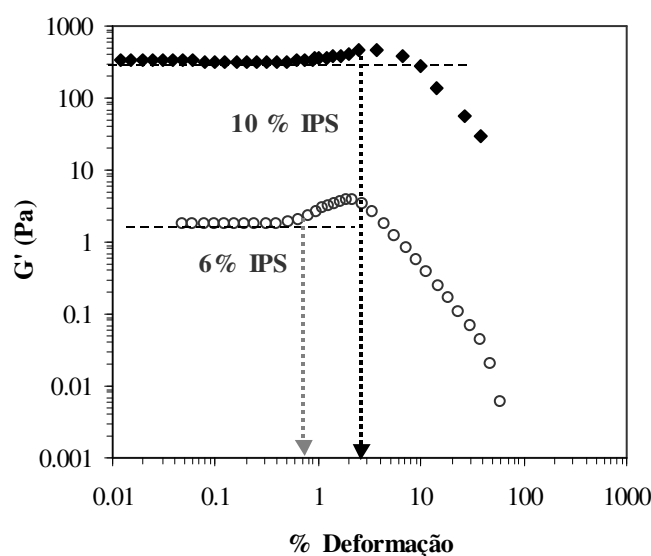


Figura 3.17- Variação do módulo de armazenamento, G' , em função da deformação para os sistemas com uma concentração de proteína de 6 % (○) e 10 % (◆), a pH 7, após varrimento em temperatura e frequência de oscilação de 5 rad/s.

Verifica-se que o limite máximo de deformação é aproximadamente 1 %, para a maior concentração de IPS estudada enquanto que para a concentração de 6 % de isolado, o limite de deformação foi aproximadamente 0.4 %, valores estes que se utilizaram nos ensaios realizados. Assim, a diminuição da concentração do IPS conduziu à diminuição do limite do comportamento viscoelástico linear pelo que se concluiu que o sistema contendo maior concentração de proteína é mais organizado, forte e estruturado.

3.3.5.4 Ensaios isotérmicos

Para as duas concentrações selecionadas e a temporal das propriedades viscoelásticas de apresenta a evolução ao longo do tempo do módulo de perda (G'') dos sistemas As cinéticas de maturação dos géis durante 3 h de aquecimento a 80 °C vieram confirmar alguns dos efeitos já verificados

pH neutro, investigou-se a evolução dispersões do IPS a 80 °C. A Figura 3.18 módulo de armazenamento (G') e do contendo 6 % (A) e 10 % (B) de proteína. h de aquecimento a 80 °C vieram nos ensaios não isotérmicos.

Na Figura 3.18 A é possível observar que os valores dos módulos viscoelásticos têm uma distribuição, ao longo do tempo, muito irregular e estão próximos do ruído do instrumento. Por outro lado, a cinética de maturação do gel contendo 10 % de proteína (Figura 3.18 B) mostra que tanto os módulos viscoelásticos como a tangente ao ângulo de perda

apresentaram uma variação, ao longo do tempo, muito bem definida, com um aumento gradual dos primeiros e um decréscimo gradual do segundo à medida que decorria a experiência. O cruzamento entre G' e G'' ocorreu no início do ensaio, tendo-se constatado que G' foi sempre superior a G'' como pode ser observado pelo valor de $\tan \delta$ inferior a 1, significando que para esta concentração de proteína, numa cinética de 3 h, o caráter elástico da amostra prevaleceu.

Foram também obtidos os espectros mecânicos para os dois sistemas proteicos efetuando varrimentos em frequência no final das cinéticas a 80 °C (Figura 3.19).

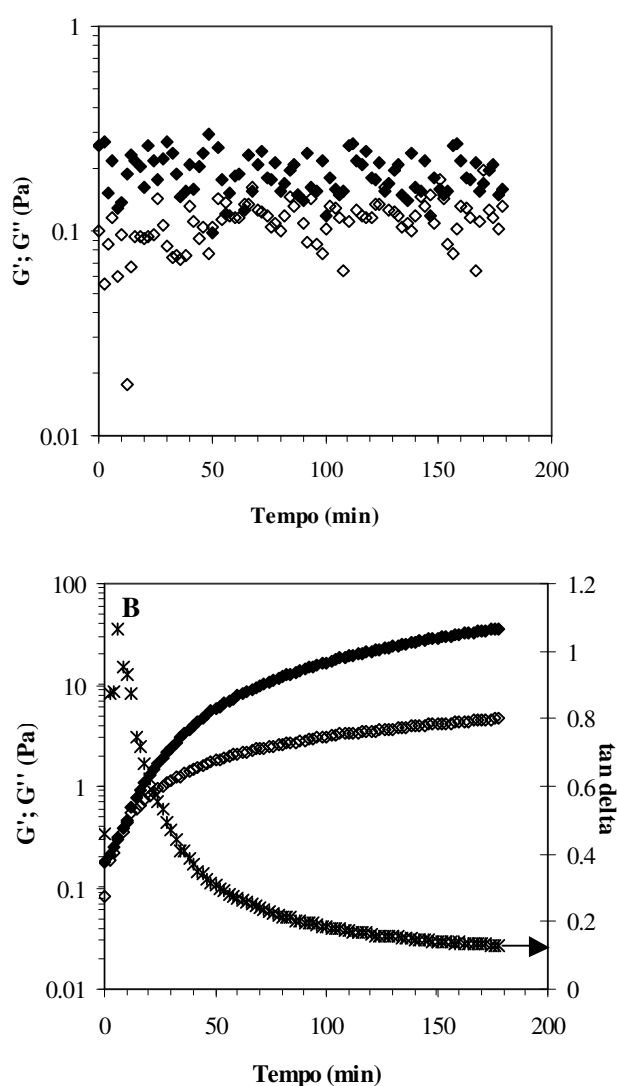


Figura 3.18 – Variação dos módulos viscoelásticos, G' (símbolos fechados), G'' (símbolos abertos) e $\tan \delta (G''/G')$ (*) durante as experiências de cura a 80 °C para os sistemas contendo 6 % (A) e 10 % de proteína (B). Ensaio realizado a uma frequência de oscilação de 5 rad/s e a deformação de 0.4 e 1 %, respetivamente.

Os espectros mecânicos dos dois sistemas em estudo revelam diferenças notórias: o comportamento do IPS a 6 % foi o de um fluido viscoelástico provavelmente na vizinhança da transição sol-gel, com G'' e G' muito dependentes da frequência a cruzarem-se para uma frequência intermédia. Para uma concentração de 10 %, o módulo de armazenamento foi sempre superior ao módulo de perda e a sua dependência da frequência foi muito menos pronunciada.

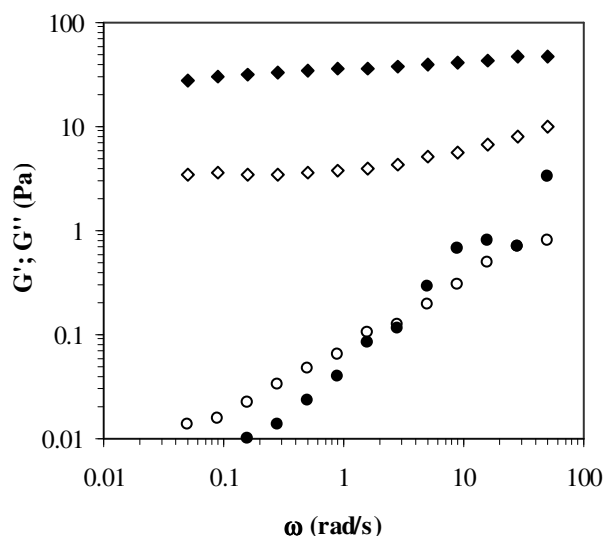


Figura 3.19 – Espectros mecânicos dos sistemas de IPS a 6 % (●,○) e 10 % (◆,◇), a pH 7, obtidos a 80 °C após maturação durante 3 h a esta temperatura. G' -símbolos fechados e G'' - símbolos abertos

3.3.6 Efeito de galactomananas na gelificação do IPS

Nesta secção descrevem-se os resultados obtidos no estudo reológico e microscópico efetuado para avaliar o efeito da adição de um polissacarídeo neutro, uma galactomanana com diferentes propriedades estruturais, na gelificação do IPS, a pH neutro.

Subdividiu-se esta secção em duas partes, uma referente à avaliação do efeito da origem da GM/grau de ramificação e a outra referente ao efeito da massa molecular da GA. Foram testadas duas concentrações de polissacarídeo, 0.2 % e 0.5 %, para duas concentrações proteicas, 6 % e 10 %. As concentrações de polissacarídeo foram escolhidas de forma a obterem-se regimes de comportamento diferentes, ou seja, a concentração de 0.2 % corresponde ao regime diluído enquanto que 0.5 % ao regime concentrado (Figura 3.10).

Recorde-se ainda que os resultados apresentados nas curvas de escoamento das GM (Figura 3.8) mostram que, para uma mesma concentração de polissacarídeo, a GM de maior viscosidade é a GG, GM de maior grau de ramificação.

3.3.6.1 Efeito da adição e origem da galactomanana

Foram testadas galactomananas extraídas a partir de três fontes diferentes, a goma de alfarroba (GA), de guar (GG) e de tara (GT), cuja principal diferença estrutural é o grau de ramificação (Tabela 3.3)

O efeito destas três gomas nas propriedades gelificantes de IPS foi avaliado por ensaios dinâmicos de varrimento em temperatura (ensaios não isotérmicos), de varrimento em tempo (ensaios isotérmicos) e varrimentos em frequência. A microestrutura de todos os sistemas foi analisada por microscopia confocal de varrimento laser.

3.3.6.1.1 Ensaios reológicos não isotérmicos

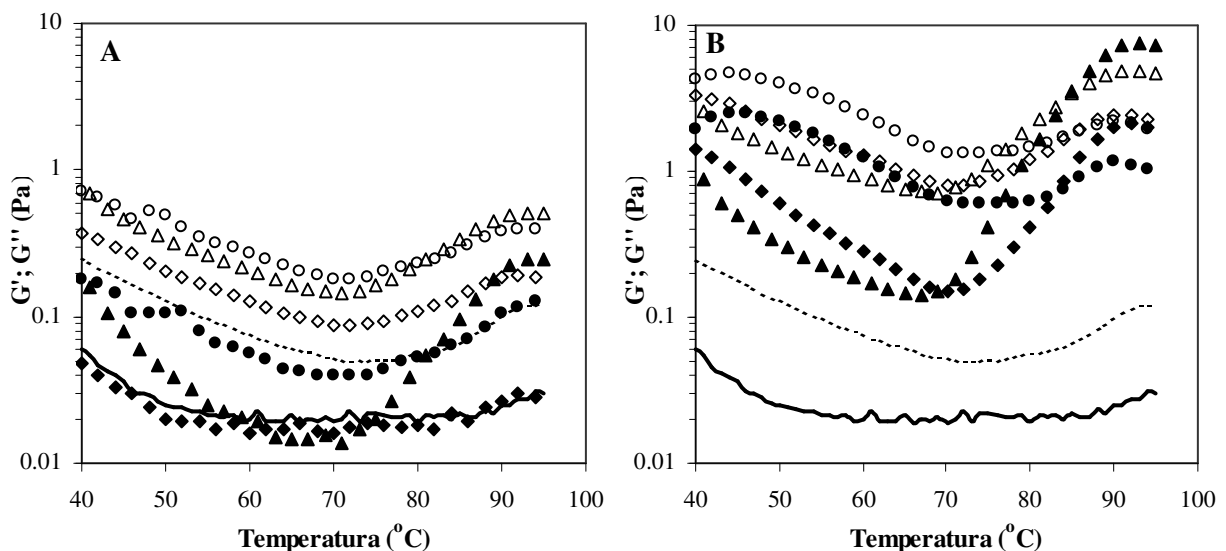
De um modo geral, a presença das GM teve um efeito positivo na formação do gel, aumentando a velocidade de formação da rede tridimensional, diminuindo a temperatura de gelificação e aumentando a força do gel (aumento dos módulos viscoelásticos). Estes efeitos foram mais pronunciados para a maior concentração de polissacarídeo e claramente dependentes do tipo de GM. Saliente-se que os sistemas contendo GM apresentaram valores dos módulos viscoelásticos superiores aos registados para o sistema contendo apenas IPS mesmo antes de se iniciar o aumento da temperatura possivelmente como resultado da elevada viscosidade das GM, principalmente GG e GA.

Para uma concentração de 6 %, a adição da menor concentração de GM resultou num ligeiro aumento dos módulos, mais acentuado para a amostra de GA, mas não resultou na formação de um gel durante a fase de aquecimento dos sistemas (Figura 3.20 A). Porém, para a maior concentração de GM e para a amostra de polissacarídeo com maior razão man/gal, G' aumentou mais rapidamente do que G'' provavelmente como resultado da segregação mais intensa entre os bioplímeros, promovendo a agregação proteica, o que

permitiu obter um gel embora bastante frágil tal como se pode observar pelos baixos valores dos módulos viscoelásticos (Figura 3.20 B).

Considerando o aumento pronunciado do módulo de armazenamento para definição da temperatura de gelificação (T_{gel}) (Renkema e van Vliet, 2002), verifica-se que o aumento da concentração de GM ou o decréscimo do grau de ramificação claramente diminui a temperatura de gelificação das misturas (Tabela 3.4).

O critério anteriormente utilizado para definir a temperatura de gelificação constitui apenas uma aproximação ao valor real crítico de gelificação pois há que ter em conta que os módulos viscoelásticos são extremamente influenciados pela ocorrência de agregação perto do ponto de gelificação.



(▲,△) GA; (◆,◇) GT; (●,○) GG

As linhas correspondem aos sistemas de IPS sem galactomanana

Figura 3.20 – Evolução dos módulos viscoelásticos (G' - símbolos fechados e linha a cheio; G'' - símbolos abertos e linha tracejada em função da temperatura (40-95 °C), a 0.4% de deformação e frequência de 5 rad/s e uma taxa de variação de temperatura de 1 °C/min, para misturas com concentração proteica de 6 % e GM com diferentes origens, a pH 7: (A) IPS + 0.2% GM; (B) IPS + 0.5 % GM.

Tabela 3.4- Temperaturas correspondentes ao crescimento acentuado de G' (T_a) e à temperatura de cruzamento entre G' e G'' (T_c), bem como valores de G' a 95 °C, para o IPS e sistemas mistos IPS/GM aquecidos entre 40 e 95 °C a 1 °C/min

Amostra	6% IPS	GG		GT		GA	
		0.20%	0.50%	0.20%	0.50%	0.20%	0.50%
T_a (°C)	87.0 ± 0.8	87.0 ± 0.4	81.2 ± 1.0	76.7 ± 0.8	72.4 ± 1.2	72.0 ± 0.31	69.2 ± 0.9
T_c (°C)	48.4* ± 0.9	69.2* ± 1.3	80.4* ± 1.1	76.1* ± 0.7	92.6* ± 0.6	78.5* ± 0.6	84.6 ± 1.2
$G'=G''$ (Pa)	0.67 ± 0.1	1.80 ± 0.8	4.50 ± 1.21	1.20 ± 0.9	2.40 ± 0.80	1.00 ± 0.22	3.20 ± 1.13
G'_{950C} (Pa)	0.03 ± 0.01	0.13 ± 0.03	0.09 ± 0.02	0.03 ± 0.01	1.90 ± 0.42	0.24 ± 0.08	7.41 ± 1.2

Amostra	10% IPS	GG		GT		GA	
		0.20%	0.50%	0.20%	0.50%	0.20%	0.50%
T_a (°C)	73.8 ± 0.9	69.7 ± 0.3	67.2 ± 0.6	70.2 ± 0.4	66.6 ± 0.3	70.0 ± 0.6	66.2 ± 0.7
T_c (°C)	81.9 ± 1.2	75.1 ± 0.8	72.1 ± 0.3	75.7 ± 1.1	72.9 ± 0.6	75.5 ± 0.7	71.4 ± 0.9
$G'=G''$ (Pa)	1.0 ± 0.3	1.9 ± 0.4	6.5 ± 0.7	2.2 ± 0.3	6.0 ± 1.0	2.2 ± 0.6	8.8 ± 0.9
G'_{950C} (Pa)	29.3 ± 1.4	187 ± 12	264 ± 9	219 ± 18	365 ± 8	209 ± 9	373 ± 10

(*) O cruzamento entre G' e G'' ocorre durante o arrefecimento (95-20 °C)

Saliente-se ainda que para a menor concentração de IPS estudada o cruzamento entre G' e G'' ocorreu durante a fase de arrefecimento, afastado do crescimento acentuado de G' , refletindo a influência da agregação proteica no módulo de armazenamento, a cinética do processo de gelificação e a formação da rede frágil tridimensional. De qualquer forma, a presença da GM deslocou o ponto de cruzamento entre G' e G'' para temperaturas mais elevadas (tempos menores de ensaio), efeito este mais acentuado para os sistemas contendo as GM com maior razão man/gal.

Aumentando a concentração de proteína para 10 % (Figura 3.21), o IPS consegue por si só gelificar mesmo na ausência de GM e observa-se, para todos os sistemas em estudo, que o cruzamento entre os módulos viscoelásticos ocorre durante a fase de aquecimento.

De um modo geral, comparando os perfis de evolução dos módulos com a temperatura a 6 e 10 %, constata-se que para temperaturas superiores à T_{gel} , o perfil de evolução dos módulos viscoelásticos, para a menor concentração de IPS é claramente dependente da presença e tipo da GM adicionada enquanto que para uma concentração de proteína de 10 % este efeito é menos pronunciado. A temperatura de cruzamento (T_c) decresce com o aumento da concentração de GM (Tabela 3.4). A adição das GM permitiu um decréscimo na temperatura de gelificação (T_{gel}): para o sistema contendo apenas IPS, G' começa a crescer por volta dos 74 °C enquanto que para os sistemas mistos, esse crescimento ocorre entre 70 ° e 66-67 °C para uma concentração de GM de 0.2 e 0.5 %, respetivamente

(Tabela 3.4). Para além disso, promoveu um aumento geral dos módulos viscoelásticos. Como seria de esperar, estes efeitos foram mais pronunciados para concentrações mais elevadas de GM (Figura 3.21-B). Observações semelhantes foram reportadas por Cavallieri *et al.* (2010) para a influência da GG na gelificação de proteínas de soja e por Zhu *et al.* (2009) ao estudar o efeito da GG na gelificação de β -conglucina.

O aumento dos módulos durante o aquecimento é atribuído ao aumento progressivo da quantidade de proteína incorporada na rede, um efeito frequentemente observado na gelificação de proteínas globulares (Verheul *et al.*, 1998) mas também como resultado de rearranjos na rede (Mellema *et al.*, 2002; Renkema e van Vliet, 2002), os quais deverão ser bastante influenciados pelos processos de separação de fases induzidos pela presença do polissacarídeo.

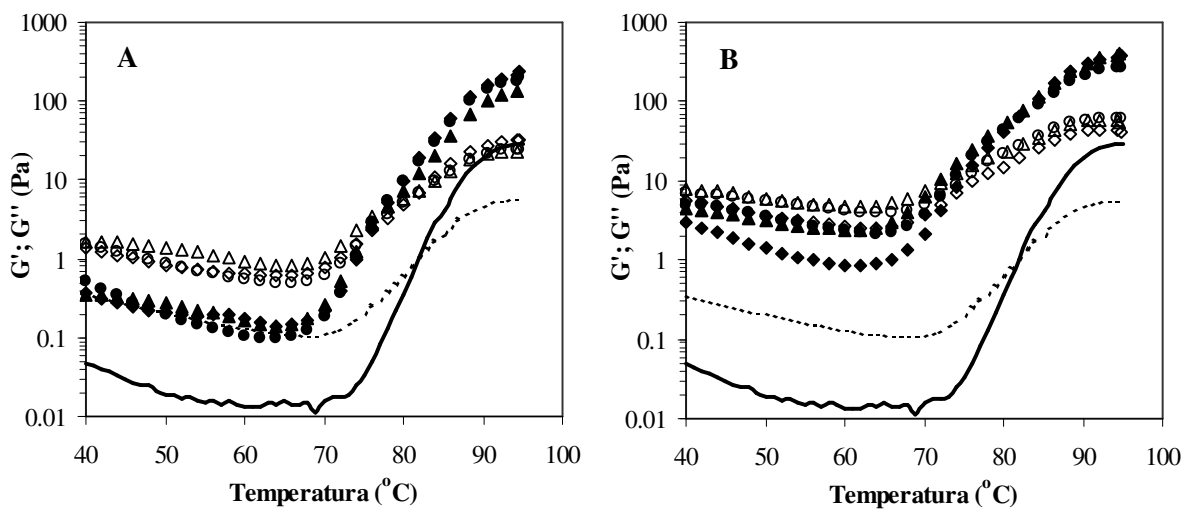


Figura 3.21 – Evolução dos módulos viscoelásticos (G' - símbolos fechados e linha a cheio; G'' - símbolos abertos e linha tracejada em função da temperatura (40-95 °C), a 1 % de deformação e frequência de 5 rad/s e uma taxa de variação de temperatura de 1 °C/min, para misturas com concentração proteica de 10 % e GM com diferentes origens, a pH 7: (A) IPS + 0.2% GM (B) IPS + 0.5 % GM: ($\blacktriangle, \triangle$) GA; (\blacklozenge, \lozenge) GT; (\bullet, \circ) GG. As linhas correspondem aos sistemas de IPS sem galactomanana

Na Figura 3.22 pode-se comparar a influência da origem e grau de ramificação das GM adicionadas nas propriedades gelificantes do sistema contendo 10 % de IPS.

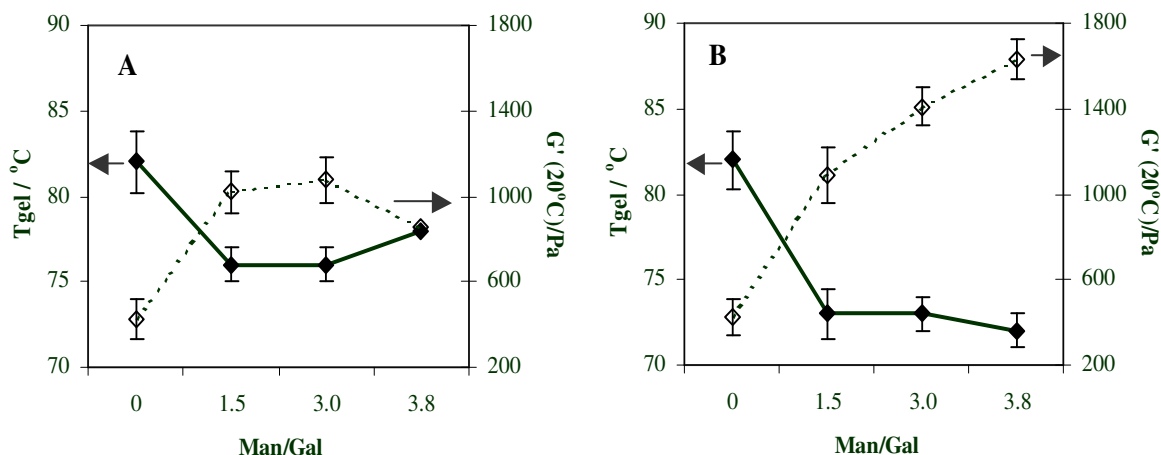


Figura 3.22 – Efeito da razão man/gal das GM adicionadas (GA-man/gal=3.8; GT-man/gal=3.0; GG-man/gal=1.5) a IPS 10%, pH 7, na temperatura de gelificação e nos valores do módulo de armazenamento a 20°C, após varrimento em temperatura controlada (1°C/min) 40-95-20°C. (A) sistema contendo 0.2 % de GM; (B) sistema contendo 0.5 % de GM

A presença da GM tem uma influência notória e positiva sobre a temperatura de gelificação e módulo de armazenamento a 20 °C em relação ao sistema IPS sem GM, para ambas as concentrações de polissacarídeo, sendo o efeito mais pronunciado para concentrações mais elevadas de GM. Para uma concentração de proteína de 10 %, a adição de 0.2 % e 0.5 % de GM fez diminuir a temperatura em cerca de 6 e 10 °C, respectivamente. Contudo, a origem e razão man/gal da GM não apresentou um efeito tão significativo como a sua presença, registrando-se pequenas diferenças na temperatura de gelificação entre os sistemas contendo GG e GT. Em relação ao módulo de armazenamento, para a concentração de GM mais elevada observa-se que o aumento da razão man/gal (diminuição do grau de ramificação) contribuiu positivamente para o aumento de G' , favorecendo o aumento da rigidez e elasticidade do gel final obtido. Contudo, na concentração mais baixa de GM, não se observaram diferenças significativas nos valores de G' entre os sistemas com as amostras GG e GT embora se tenha registado um efeito negativo da GA comparativamente às outras duas GM pois promoveu a diminuição de G' ainda que para valores muito superiores aos registados sem a adição de GM.

No arrefecimento controlado ($1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$) de 95 a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, os sistemas em análise seguem o comportamento reportado por outros autores (Renkema *et al.*, 2002; Renkema e van Vliet, 2002): observa-se um ligeiro aumento de G' associado ao decréscimo de mobilidade das cadeias proteicas e ao aumento de rigidez da rede polimérica. Esta fase é descrita como sendo essencialmente termoreversível o que sugere a não formação de ligações covalentes durante o arrefecimento (Renkema e van Vliet, 2002).

A rigidez dos géis de todos os sistemas aumentou consideravelmente com a diminuição da temperatura, de forma linear. Por outro lado, a taxa de crescimento de G' mostrou-se dependente da origem da GM, tendo aumentado com o decréscimo do grau de ramificação, como se constata pelos valores de declive para a GA, GT e GG, respetivamente, 15.8; 13.0; 10.6 Pa/s. Com o decréscimo controlado da temperatura observou-se um aumento monótono do valor dos módulos viscoelásticos embora muito mais pronunciado no caso do módulo de armazenamento. O aumento de G' traduz o aumento de rigidez do gel durante o arrefecimento colocando em evidência o papel das ligações de hidrogénio. A Figura 3.23 apresenta o perfil de evolução de G' e G'' durante o arrefecimento dos sistemas contendo IPS a 10 % e GM a 0.5 %.

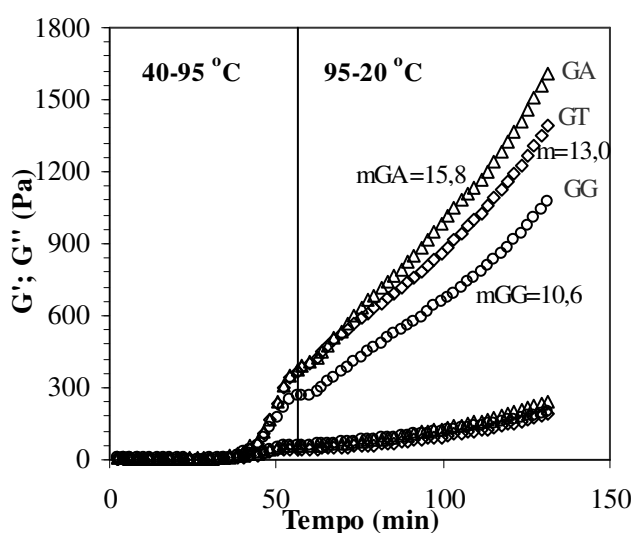


Figura 3.23- Variação de G' e G'' com o tempo de experiência não isotérmica num ciclo 40-95-20 $^{\circ}\text{C}$ ($1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$), a 1% de deformação e 5 rad/s de sistemas contendo IPS a 10% e GM a 0.5%: ($\blacktriangle, \triangle$) GA; (\blacklozenge, \lozenge) GT; (\bullet, \circ) GG. Apresentam-se os valores dos declives (m) correspondentes à taxa de variação de G' com o tempo, para a fase terminal do arrefecimento

Foram obtidos os espectros mecânicos das misturas IPS/GM no final das rampas de arrefecimento (Figura 3.24 e 3.25).

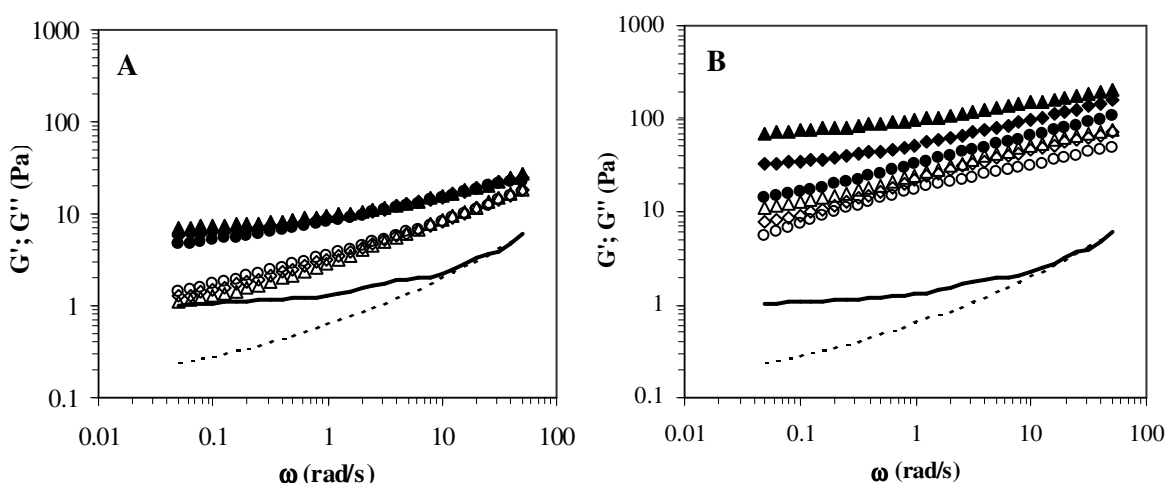


Figura 3.24- Espectros mecânicos (G' -símbolos fechados e linha a cheio; G'' - símbolos abertos e linha tracejada), a 20 °C, das misturas com concentração proteica de 6 % e GM com diferentes origens, a pH 7: (A) IPS + 0.2 % GM (B) IPS + 0.5 % GM: ($\blacktriangle, \triangle$) GA; (\blacklozenge, \lozenge) GT; (\bullet, \circ) GG
As linhas correspondem aos sistemas de IPS sem galactomanana

Verificou-se que a adição de GM ao IPS teve sempre um efeito positivo no caráter viscoelástico do sistema proteico. Para ambas as concentrações de GM estudadas, o efeito da adição destes polissacarídeos foi o de aumentar a rigidez do gel, o que se traduziu num aumento de G' em relação ao sistema proteico sozinho. Contudo, para a menor concentração de GM (Figura 3.24-A), o efeito da origem e grau de ramificação das amostras de GM foi pouco visível, como se pode constatar pela similaridade dos espectros mecânicos dos sistemas contendo as GM. Tal como o IPS, as misturas exibiram o comportamento de um gel muito frágil em que G' é ligeiramente superior a G'' , em toda a gama de frequências testada mas ambos os módulos viscoelásticos são ainda bastante dependentes da frequência de oscilação.

Porém, com o aumento da concentração de GM para 0.5 % (Figura 3.24-B), observou-se um aumento mais pronunciado dos valores de G' e G'' comparativamente com o sistema proteico sozinho sendo este efeito menor para a GM com maior grau de ramificação. A 0.5 % de GG, G' é superior a G'' com os módulos praticamente paralelos à escala, com $G' \sim \omega^{0.30}$ (Tabela 3.5), sugerindo uma contribuição relativamente elevada dos componentes viscosos comparativamente às restantes GM. Saliente-se ainda que as misturas contendo

GA foram as únicas que apresentaram, para ambas as concentrações analisadas, valores de $\tan \delta$ inferiores aos registados para o IPS, ao longo de toda a gama de frequências analisadas. Observa-se ainda que para baixas frequências o valor de G' dos sistemas contendo as diferentes GM é diferente entre si e, com o progressivo aumento da frequência de oscilação, essas diferenças diminuem.

Para uma concentração de proteína de 10 %, os espectros mecânicos dos sistemas mistos mostram um perfil viscoelástico similar ao descrito para o IPS, embora os valores dos módulos viscoelásticos tenham sido deslocados para valores consideravelmente superiores (Figura 3.25).

Os valores de $\tan \delta$ e a dependência de G' com a frequência (Tabela 3.5) revelam que os sistemas mistos apresentam maior caráter viscoso (menos elásticos, maior $\tan \delta$ e maior constante M) do que o sistema contendo apenas IPS. Estes efeitos foram mais acentuados para a mistura contendo GG e para a maior concentração de GM.

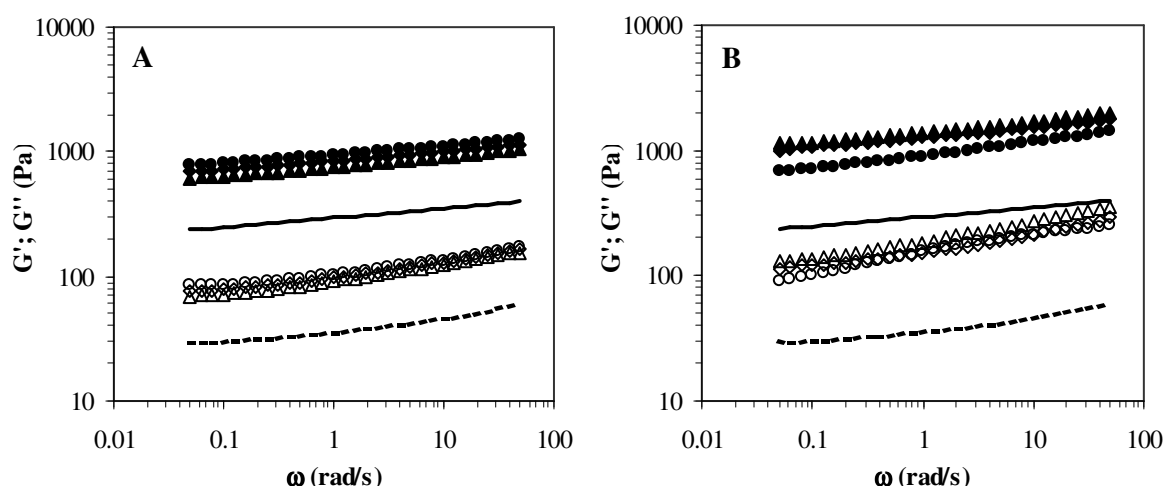


Figura 3.25- Espectros mecânicos (G' -símbolos fechados e linha a cheio; G'' - símbolos abertos e linha tracejada), a 20 °C, das misturas com concentração proteica de 10 % e GM com diferentes origens, a pH 7: (A) IPS + 0.2% GM (B) IPS + 0.5 % GM: ($\blacktriangle, \triangle$) GA; (\blacklozenge, \lozenge) GT; (\bullet, \circ) GG. As linhas correspondem aos sistemas de IPS sem galactomanana

Ao contrário do que era esperado, os módulos viscoelásticos do sistema contendo a GG na concentração de 0.5 % foram inferiores aos registados na concentração de 0.2 %, para todos os ensaios efetuados. Efeito semelhante foi já descrito por Fitzsimons *et al.* (2008),

ao estudar a influência da concentração da GG na gelificação de proteínas do soro do leite. Os resultados mostraram que para a concentração de 0.5 % de GG, os módulos viscoelásticos foram superiores aos registados para o sistema sem GG mas com uma maior dependência face à frequência de oscilação e uma menor separação entre G' e G'' , indicando que uma parte significativa da fração “sol” não integrou a rede contínua, possivelmente porque o aumento da concentração de GG aumentou as porções ocupadas pelo polissacarídeo e impediu que a proteína formasse uma rede tridimensional compacta.

De forma a sistematizar a influência do grau de ramificação da GM nas propriedades viscoelásticas dos sistemas finais, aplicou-se a lei de potência (Equação 3.7) (Ikeda e Foegeding, 1999) à variação de G' com a frequência de oscilação, determinando-se o valor de M (Tabela 3.4):

$$G' = A \times \omega^M \quad (3.7)$$

onde o grau de dependência de G' com a frequência (ω) pode ser expresso pela constante M . O valor das duas constantes, A e M são determinados por aplicação/ajuste da equação anterior aos dados obtidos.

Para a maior concentração de proteína, os géis são mais rígidos, com maior carácter elástico, devido ao estabelecimento de maior densidade de zonas de junção entre um maior número de moléculas proteicas, originando um módulo de armazenamento que apresenta uma variação com a frequência que, para além de menor, é semelhante em toda a gama de frequências de oscilação estudadas.

Tabela 3.5 – Valores da constante M para os sistemas em estudo a 20 °C

[IPS]	6%		10%	
[GM]	0.20%	0.50%	0.20%	0.50%
IPS/GA	0.188 ± 0.011	0.159 ± 0.016	0.107 ± 0.005	0.070 ± 0.010
IPS/GT	0.210 ± 0.017	0.237 ± 0.017	0.078 ± 0.002	0.074 ± 0.006
IPS/GG	0.238 ± 0.014	0.302 ± 0.010	0.078 ± 0.003	0.084 ± 0.002
IPS	0.221 ± 0.019		0.075 ± 0.007	

O módulo de armazenamento (G') para materiais puramente elásticos é, de um modo geral, independente da frequência, não existindo uma contribuição significativa do módulo de perda (G''). Contudo, os géis alimentares normalmente possuem uma pequena contribuição da componente viscosa (G''), resultando num grau de dependência de G' com a frequência que reflete a relaxação dos componentes (Ikeda e Foegeding, 1999). Como é observado para os sistemas em análise, G' aumenta ligeiramente com o aumento da frequência aplicada, sendo a sua dependência com a frequência traduzida pelo expoente M , o qual é um indicativo da natureza viscoelástica dos géis: M é zero para géis puramente elásticos, tornando-se superior com o aumento da contribuição relativa da componente viscosa (géis menos elásticos). Assim, os baixos valores de M obtidos para os sistemas em análise sugerem que os géis são predominantemente elásticos, corroborando os resultados obtidos por análise dos espectros mecânicos.

O aumento da concentração da proteína de 6 para 10 % diminuiu o valor da constante M traduzindo um decréscimo da probabilidade de ocorrência de rearranjos e uma menor mobilidade do sistema. Com o aumento da concentração proteica formam-se géis mais elásticos e com menor contribuição da componente viscosa. No que se refere ao efeito do grau de ramificação, constata-se que o aumento da concentração da GA provoca um decréscimo da constante para ambas as concentrações proteicas enquanto que o aumento da concentração de polissacarídeo, para as restantes GM em análise desencadeia o efeito inverso, principalmente a 6 %, promovendo um aumento dos valores de M , mais sentido para o sistema com a GM de maior grau de ramificação (GG).

As conclusões obtidas foram reforçadas pela análise dos valores de $\tan \delta$ dos sistemas em estudo (Figura 3.26).

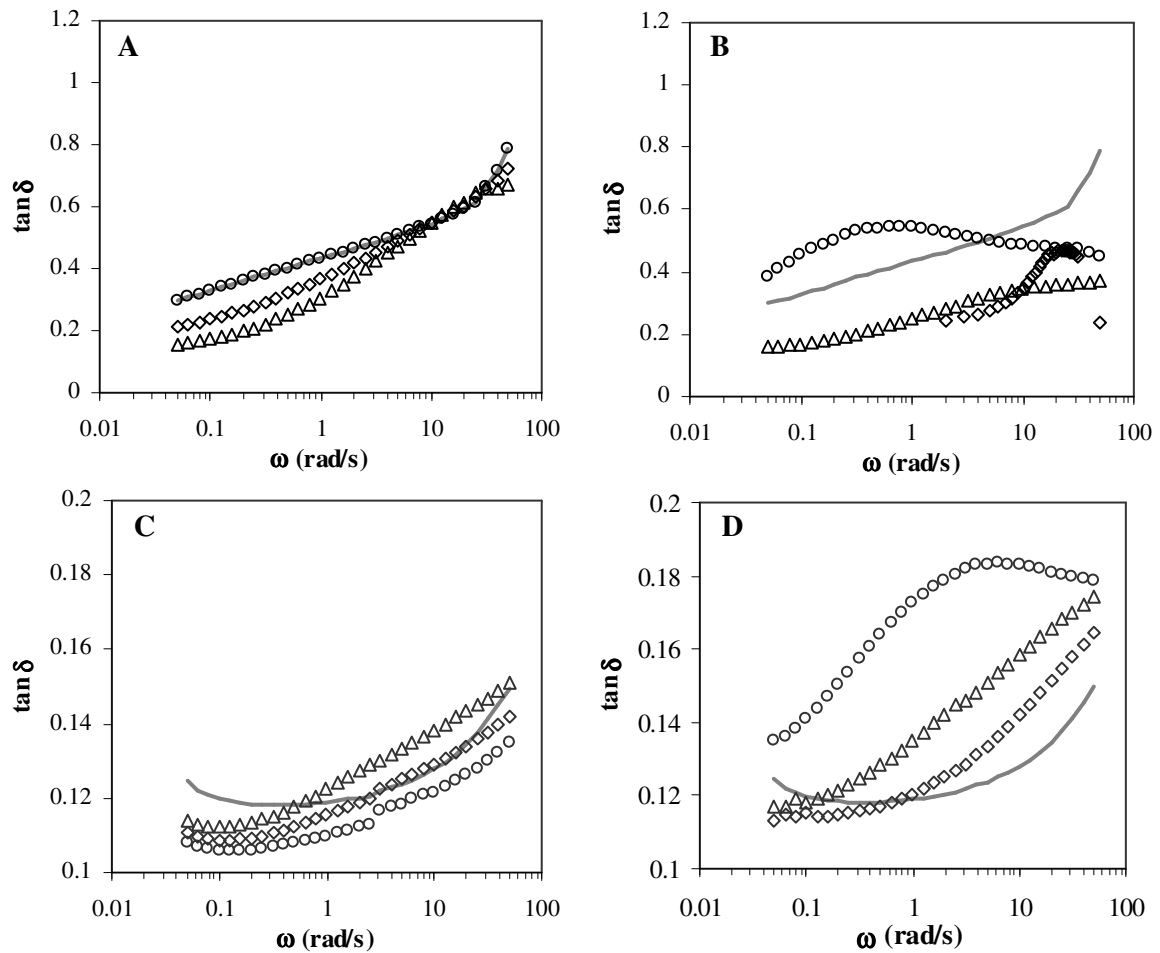


Figura 3.26- Variação da tangente ao ângulo de perda ($\tan \delta$) de IPS e de sistemas IPS + GM, para as concentrações de proteína de 6 % (A e B) e 10 % (C e D) para as duas concentrações de GM em estudo, 0,2 % (A e C) e 0,5 % (B e D): (Δ) GA; (\diamond) GT; (\circ) GG. A linha corresponde ao sistema de IPS sem galactomanana

No seguimento dos ensaios descritos, foram realizados varrimentos em deformação dos sistemas contendo as GM de diferentes origens. Os resultados revelaram que a adição das GM, independentemente da origem teve um efeito positivo na organização e consolidação dos sistemas como se pode observar pelo aumento dos valores de G' e da zona de comportamento viscoelástico linear. Com o aumento do polissacarídeo adicionado, a diferença de efeito entre as três GM é menos acentuado (Figura 3.27 B) e a região viscoelástica linear tende a prolongar-se. Resultados semelhantes foram descritos por Zhu

et al. (2009) que constatou o efeito da concentração de GG no aumento da região do comportamento viscoelástico linear de géis de β -conglícinina.

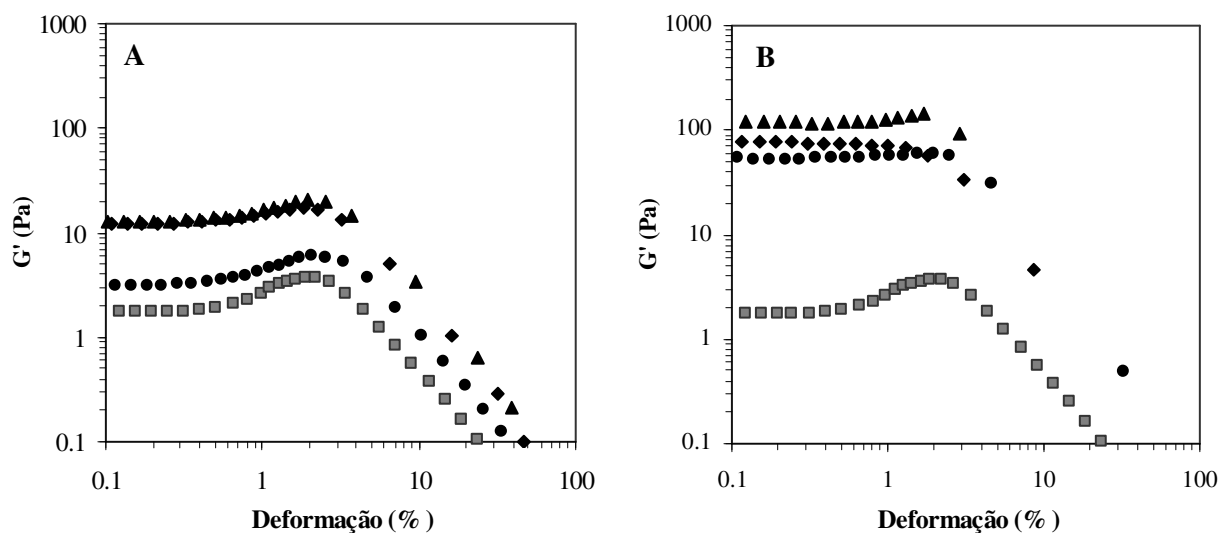


Figura 3.27- Varrimento em deformação ($\omega=5$ rad/s; 20°C) dos sistemas IPS e IPS/GM com uma concentração de proteína de 6 % e 0.2 % de GM (A) e 0.5 % de GM (B).

(▲,) GA; (◆) GT; (●) GG. Símbolos cinzentos correspondem aos sistemas de IPS sem galactomanana

Com o aumento da concentração de proteína para 10 %, o comportamento linear estendeu-se a deformações mais elevadas não sendo por isso, na gama de deformações aplicadas aos sistemas a 6 %, visível a diminuição drástica de G' . Na Figura 3.28, a título exemplificativo, compara-se o varrimento em deformação do sistema IPS 6 % + GG 0.2 % e IPS 10 % + GG 0.2 %.

Os resultados mostram uma menor fragilidade das interações existentes nos sistemas contendo maior concentração de proteína bem como uma menor sensibilidade à deformação aplicada das estruturas existentes nesses sistemas, independentemente do grau de ramificação e concentração de GM, o que comprova a existência de uma estrutura de gel, como se constatou pelos resultados dos varrimentos em frequência.

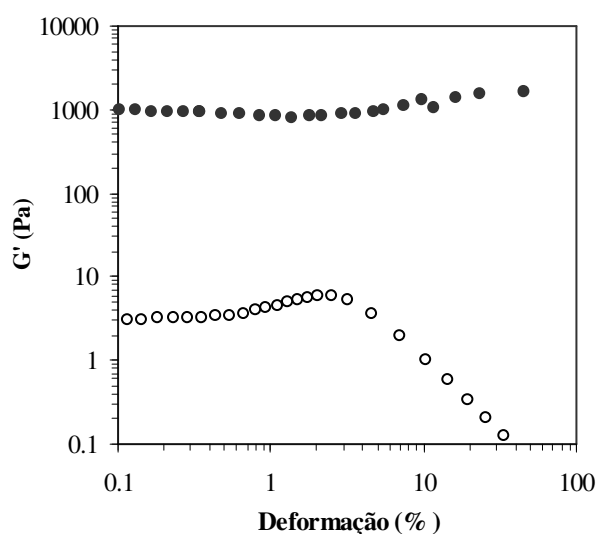


Figura 3.28- Varrimento em deformação ($\omega=5$ rad/s; 20°C) dos sistemas IPS/GM com uma concentração de proteína de 6 % (símbolos abertos) e 10 % (símbolos fechados) e 0.5 % de GG

3.3.6.1.2 Ensaios reológicos isotérmicos

As cinéticas de maturação dos géis de IPS/GM a 80°C vieram confirmar alguns dos efeitos já verificados nos ensaios não isotérmicos. Assim, para uma concentração de proteína de 6 %, a presença da GM causou uma importante estruturação dos sistemas durante o aquecimento a 80°C , principalmente para os sistemas contendo a GM de maior razão man/gal e para a maior concentração de polissacarídeo estudada (Figura 3.29).

Para 0.2 % de GT ou de GG, ambos os módulos aumentam comparativamente com o IPS mas as alterações com o tempo são pequenas com os valores dos módulos a revelar a existência de sistemas predominantemente viscosos. A adição de 0.2 % de GA claramente alterou o perfil viscoelástico durante a cura, com G' superior a G'' desde o início do ensaio, registando-se uma taxa de crescimento dos módulos mais acentuado no início seguido de uma fase com um declive menor, demonstrando processos mais lentos (Figura 3.29-A). A amostra de GM menos ramificada induziu a ocorrência de gelificação e um aumento significativo de G' . O aumento da concentração de GM para 0.5 % desencadeou efeitos mais acentuados e permitiu que o perfil de maturação dos sistemas contendo GM se afastasse significativamente do registado para o IPS sem GM (Figura 3.29-B). Para esta concentração de polissacarídeo, todas as amostras de GM promoveram a ocorrência de gelificação dos sistemas mistos IPS/GM.

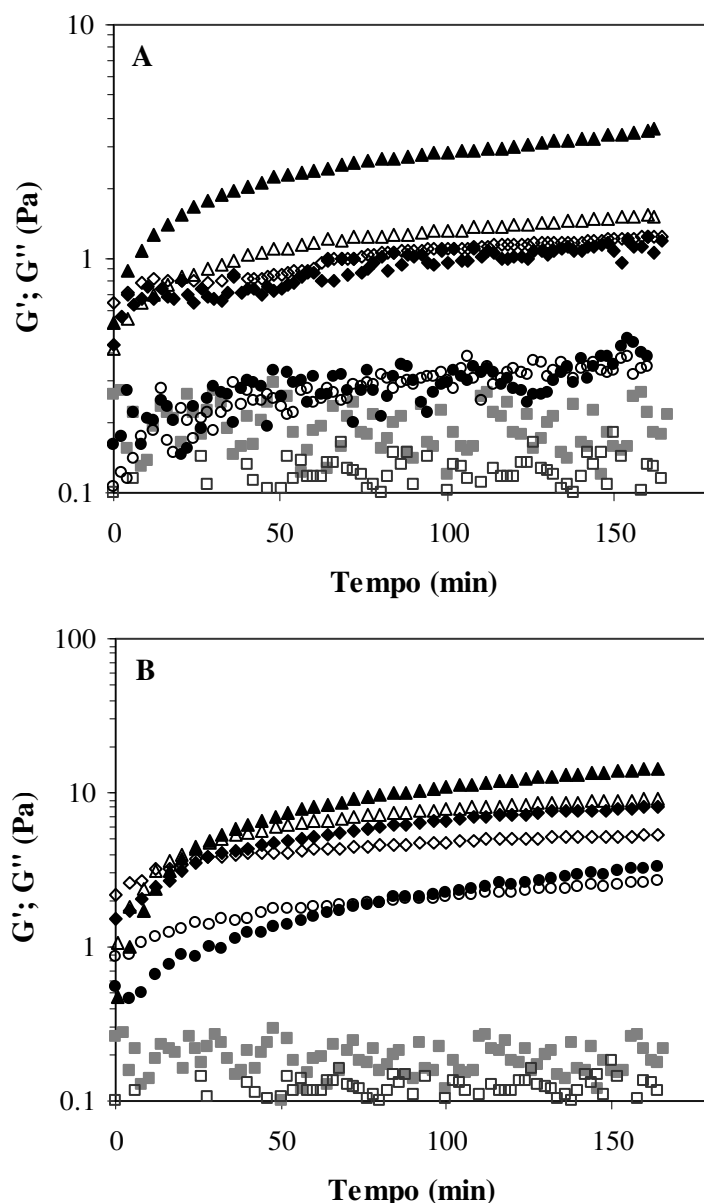


Figura 3.29- Variação dos módulos viscoelásticos (G' -símbolos fechados; G'' - símbolos abertos) durante as experiências de cura a 80 °C ($\omega= 5$ rad/s; $\gamma=0.4\%$) para os sistemas com 6 % de IPS e GM a 0.2 % (A) e 0.5 % (B). ($\blacktriangle, \triangle$) GA; (\blacklozenge, \lozenge) GT; (\bullet, \circ) GG. Símbolos cinzentos correspondem aos sistemas de IPS sem galactomanana

O efeito da origem e grau de ramificação da GM fez-se sentir no valor dos módulos viscoelásticos e no tempo em que ocorreu o cruzamento entre G' e G'' (ponto de gelificação), com o aumento do primeiro e uma redução do segundo com o aumento da razão man/gal (diminuição do grau de ramificação): ponto de cruzamento entre G' e G'' ocorreu a 81 min, 29 min e 25 min para a GG, GT e GA, respetivamente. Assim, estes resultados demonstram que o grau de ramificação influencia o ponto de gelificação.

Saliente-se ainda que a presença dos polissacarídeos de elevada massa molecular também aumentou o caráter viscoso dos sistemas e influenciou a relação entre os módulos viscoelásticos, sendo este efeito mais evidente no início dos ensaios.

Para uma concentração de proteína de 10 % (Figura 3.30), as curvas de maturação do gel seguiram o comportamento geralmente observado para a gelificação de biopolímeros, incluindo proteínas globulares e misturas com polissacarídeos (Tobitani e Ross-Murphy, 1997; Kavanagh *et al.*, 2000; Ikeda, 2003; Monteiro *et al.*, 2005). Para 10 % de proteína estávamos já perante um sistema que gelificava mesmo sem a adição de GM. A 0.5 % de GM, G' foi superior a G'' desde o início dos testes para todas as misturas IPS/GM enquanto a 0.2 % de GM, o tempo para cruzamento de G' e G'' não foi significativamente influenciado pelo tipo de GM.

A adição de GM claramente aumentou o valor dos módulos viscoelásticos durante a maturação do gel bem como a taxa de gelificação e promoveu ainda uma ligeira diminuição do tempo de gelificação com a adição de GM. Para ambas as concentrações de GM estudadas (Figura 3.30-A e B), a GM de menor grau de ramificação, GA, foi a que desencadeou um maior efeito.

As amostras de GG e GT exibiram efeitos semelhantes. O efeito da concentração de GM não alterou o perfil de gelificação mas aumentou o valor dos módulos viscoelásticos dos sistemas desde o início da experiência.

O efeito da razão man/gal no perfil de maturação dos géis a 80 °C e na velocidade de gelificação foi atenuada com o aumento da concentração do IPS.

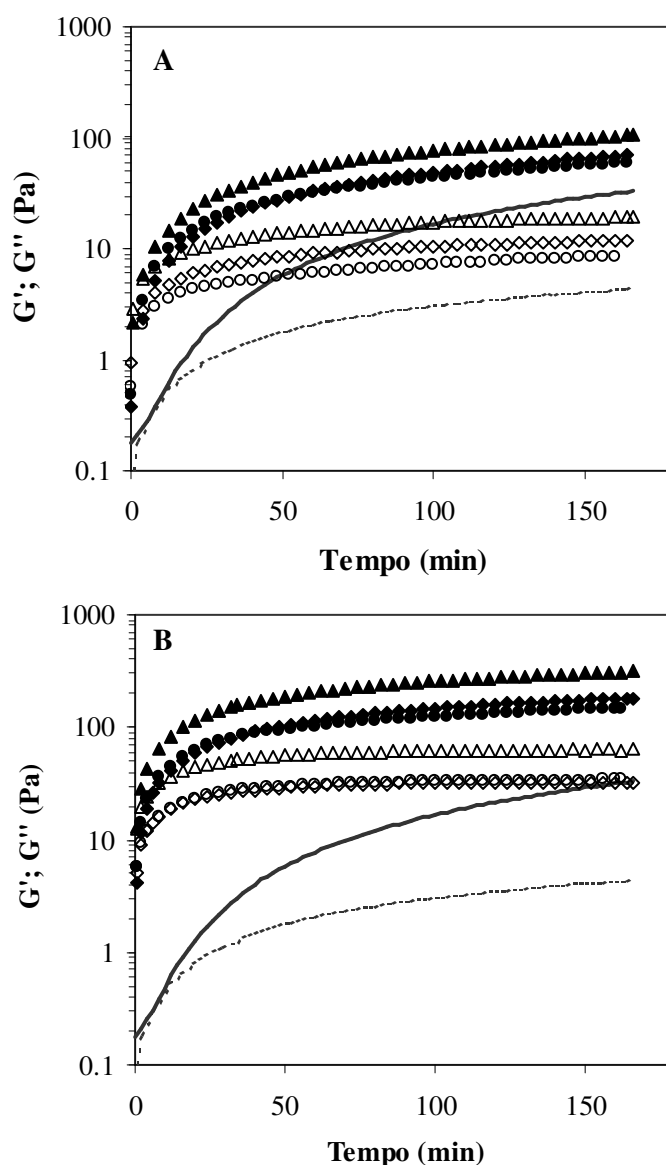


Figura 3.30- Variação dos módulos viscoelásticos (G' -símbolos fechados e linha a cheio; G'' -símbolos abertos e linha tracejada) durante as experiências de cura a 80 °C ($\omega = 5$ rad/s; $\gamma = 1\%$) para os sistemas com 10 % de IPS e GM a 0.2 % (A) e 0.5 % (B), a pH 7. ($\blacktriangle, \triangle$) GA; (\blacklozenge, \lozenge) GT; (\bullet, \circ) GG. As linhas correspondem aos sistemas de IPS sem galactomanana

Foram também obtidos os espectros mecânicos para os vários sistemas IPS/GM estudados efetuando varrimentos em frequência no final das cinéticas a 80 °C (Figuras 3.31 e 3.32). O espectro mecânico obtido para o IPS a uma concentração de 6 % correspondeu a um sistema não gelificado mas estruturado, com cruzamento de G' e G'' a frequências intermédias, possivelmente como resultado de uma dispersão de moléculas proteicas agregadas.

Comportamento viscoelástico semelhante foi já descrito por Hua *et al.* (2005). A adição de GM evidenciou claramente a ocorrência de gelificação.

Para a menor concentração de GM adicionada (Figura 3.31-A) observa-se que o comportamento viscoelástico do sistema com GA distingue-se dos restantes, quer pelo valor dos módulos ser superior quer pela sua menor dependência face à frequência de oscilação, significando que a presença de GA levou a uma maior diminuição da mobilidade molecular do que no caso das outras GM. Por outro lado, G' foi sempre superior a G'' ao longo da gama de frequências analisadas o que não aconteceu nos restantes sistemas. Para além disso, observa-se um *plateau* elástico a baixas frequências, característico dos espectros mecânicos de GA a 0.5 %.

O efeito da presença de GG é semelhante ao da GT e aproxima-se do registado para o IPS sem GM. No caso dos sistemas mistos contendo GT e GG observa-se o cruzamento entre G' e G'' apenas para os valores mais elevados de frequência, com $G' \propto \omega^{0.7}$ (Tabela 3.6) o que revela o carácter predominantemente viscoso destes sistemas.

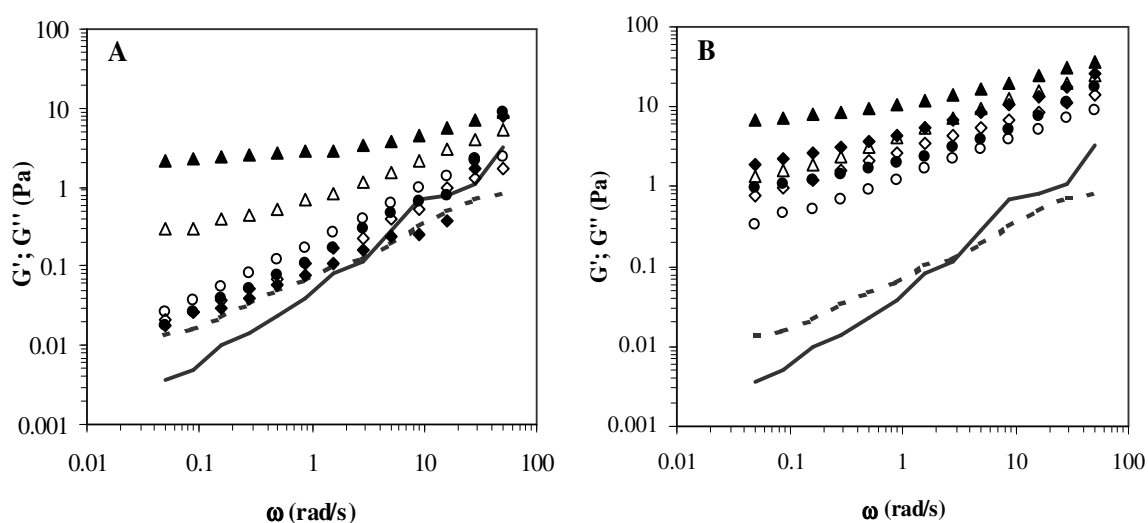


Figura 3.31- Espectros mecânicos a 80 °C para os sistemas mistos IPS a 6 % e GM a 0.2 % (A) e 0.5 % (B), a pH 7, obtidos após as experiências isotérmicas (G' -símbolos fechados e linha a cheio; G'' - símbolos abertos e linha tracejada). ($\blacktriangle, \triangle$) GA; (\blacklozenge, \lozenge) GT; (\bullet, \circ) GG. As linhas correspondem aos sistemas de IPS sem galactomanana

Para IPS a 6 % mas com maior quantidade de GM adicionada (Figura 3.31-B), $G' > G''$ em toda a gama de frequências analisada, com o módulo de armazenamento a tender para um *plateau* elástico a baixas frequências, embora a diferença entre os módulos seja pequena e

o caráter viscoso destes sistemas ainda bastante elevado. Uma vez mais, os efeitos mais pronunciados foram observados para a GA, GM de menor grau de ramificação.

Para a maior concentração de proteína em estudo (Figura 3.32), o sistema foi já capaz de gelificar por si só com G' superior a G'' ao longo de toda a gama de frequências testadas e apenas uma ligeira dependência face à frequência. A adição de GM não promoveu alterações significativas no perfil viscoelástico descrito, mas registou-se um aumento do valor de ambos os módulos e um ligeiro aumento da dependência de G' com a frequência (Tabela 3.6) ($G' \propto \omega^{0.09-0.11}$) comparativamente com o IPS sem GM ($G' \propto \omega^{0.075}$) sugerindo uma maior possibilidade de ocorrência de rearranjos moleculares nos sistemas mistos.

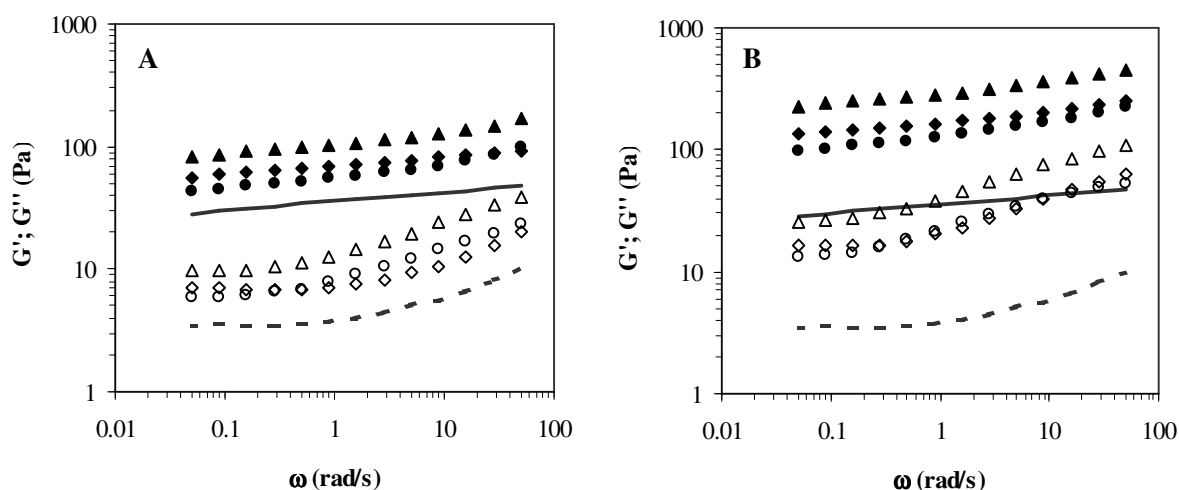


Figura 3.32- Espectros mecânicos a 80 °C para os sistemas mistos IPS a 10 % e GM a 0.2 % (A) e 0.5 % (B), a pH 7, obtidos após as experiências isotérmicas (G' -símbolos fechados e linha a cheio; G'' - símbolos abertos e linha tracejada). ($\blacktriangle, \triangle$) GA; (\blacklozenge, \lozenge) GT; (\bullet, \circ) GG. As linhas correspondem aos sistemas de IPS sem galactomanana

Aplicou-se a lei de potência (Equação 3.7) à variação de G' com a frequência de oscilação obtida nos ensaios de varrimento em frequência a 80 °C determinando-se assim os valores da constante M para os sistemas em estudo (Tabela 3.6).

Analisando os valores de M calculados constata-se que a adição da GM tem efeitos opostos em função da concentração do IPS: para a menor concentração de proteína, a adição de GM promoveu a diminuição significativa do valor de M , sugerindo que a presença de GM diminui a possibilidade de ocorrência de rearranjos moleculares, diminuindo assim a mobilidade molecular.

Tabela 3.6 – Valores da constante M , a 80 °C, para os sistemas em estudo

[IPS]	6%		10%	
[GM]	0.20%	0.50%	0.20%	0.50%
IPS/GA	0.196 ± 0.017	0.247 ± 0.024	0.095 ± 0.006	0.097 ± 0.003
IPS/GT	0.736 ± 0.008	0.366 ± 0.018	0.070 ± 0.009	0.088 ± 0.005
IPS/GG	0.789 ± 0.010	0.408 ± 0.009	0.110 ± 0.004	0.119 ± 0.003
IPS	0.983 ± 0.012		0.075 ± 0.007	

O caráter elástico dos sistemas aumentou com a adição da GM. A GA foi a amostra de GM que mais fortemente exerceu o efeito descrito. Por outro lado, para a maior concentração de proteína, o efeito da presença da GM foi menos pronunciado e, de um modo geral, desencadeou o aumento da constante M , o que traduz um aumento do caráter viscoso dos sistemas com a adição do polissacarídeo, como se comprova pelo aumento dos valores de $\tan \delta$ com a adição de GM (Figura 3.33).

A amostra com maior grau de ramificação (a amostra de GG) foi a amostra que mais contribuiu para o aumento do caráter viscoso dos sistemas. O efeito da concentração de GM também se fez sentir e de formas opostas em função da concentração de IPS: para uma concentração de IPS de 6 %, o aumento da concentração de GM fez diminuir o valor de M ao passo que para uma concentração de proteína de 10 %, regista-se uma tendência para os valores de M aumentarem.

Assim, os resultados obtidos sugerem que em condições em que a rede de proteína não está bem estabelecida, quando a concentração é inferior à concentração crítica para gelificação, a presença de GM contribui para a elasticidade da rede possivelmente porque existirá separação de fases e aumento da concentração local de cada biopolímero, aumentando a densidade de zonas de junção. Por outro lado, em condições em que a quantidade de proteína existente no meio é suficiente para formar uma rede contínua, a presença de GM não influencia a formação de uma nova rede tridimensional de gel, pode levar ao aumento de zonas de junção, mas terá ainda um efeito maior na dissipação de energia do sistema.

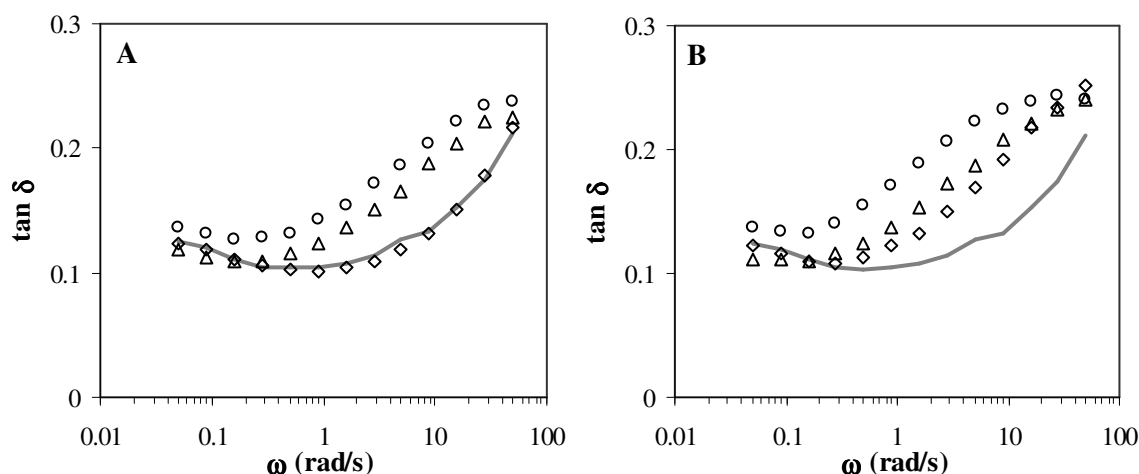


Figura 3.33- Variação da tangente ao ângulo de perda ($\tan \delta$) de IPS e de sistemas IPS + GM, para uma concentração de proteína de 10% e 0.2 % (A) e 0.5 % de GM (B): (\triangle) GA; (\diamond) GT; (\circ) GG. A linha corresponde ao sistema de IPS sem galactomanana

3.3.6.1.3 Microscopia confocal de varrimento laser

As amostras de IPS e de misturas IPS/GM foram analisadas por microscopia confocal de varrimento de laser, após serem sujeitas a um tratamento térmico semelhante ao utilizado nos ensaios reológicos de varrimento de temperatura (seção 3.3.5.2.2). Às amostras foi adicionada rodamina B o que permitiu marcar a proteína enquanto que o polissacarídeo permaneceu sem fluorescência. No entanto, alguns ensaios foram realizados com dupla marcação de forma a confirmar a organização microestrutural de ambos os biopolímeros nos sistemas mistos.

A Figura 3.34 mostra as imagens obtidas por CLSM onde as zonas claras correspondem à proteína, devido à fluorescência da rodamina B a elas ligada na gama de comprimento de onda excitada e as zonas escuras às zonas sem proteína, na sua maioria compostas pelo polissacarídeo. A amostra de IPS mostra uma fluorescência uniforme correspondente a uma microestrutura homogênea (Figura 3.34 A). De um modo geral, a adição de GM alterou drasticamente a microestrutura do IPS, conduzindo à separação de fases, com uma descontinuidade da microestrutura do gel formado comparativamente com a observada para o gel de proteína puro. A morfologia das fases obtidas mostrou ser dependente da concentração dos dois biopolímeros.

O processo de separação de fases, resultante da mistura de dois biopolímeros, em que uma delas é composta predominantemente por proteína enquanto a outra é rica em

polissacarídeo, é um processo frequentemente descrito para misturas entre proteínas e polissacarídeos (Tolstoguzov, 2003). A pH 7, como as proteínas constituintes do IPS terão cargas negativas e a GM é neutra, poderá ocorrer uma separação de fases onde a rede proteica forma uma fase contínua que acomoda as cadeias de polissacarídeo. A separação de fases ocorrida por adição de polímeros a proteínas globulares é um processo frequentemente descrito na literatura (Clark *et al.*, 1983; Norton e Frith, 2001; Ortiz *et al.*, 2004; Monteiro *et al.*, 2005; Tavares *et al.*, 2005; Braga *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2009; Cavallieri *et al.*, 2010; Jaramillo *et al.*, 2011).

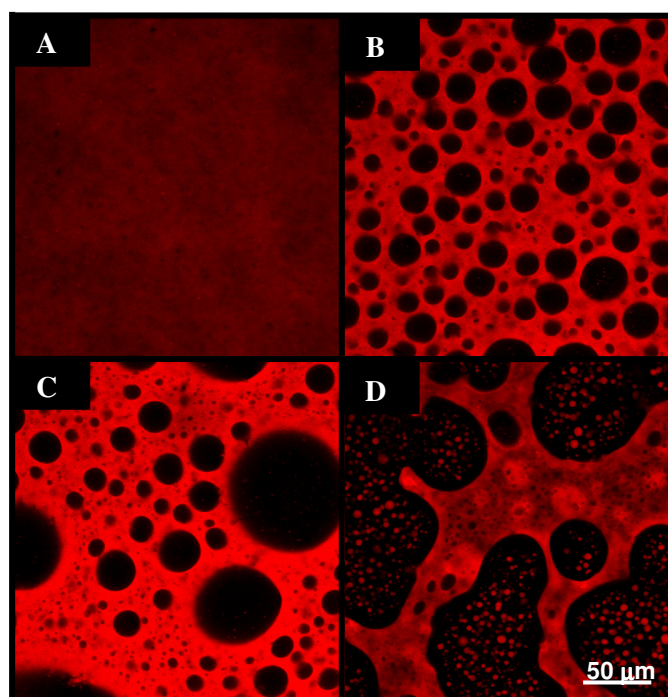


Figura 3.34- Imagens de CLSM dos géis de IPS 10 %, corados com *rodamina B*. (A) sem GM; (B) GG 0.2 %; (C) GT 0.2 % e (D) GA 0.2 %

Para uma concentração de proteína de 10 % e 0.2 % de GM adicionada, a fase descontínua predominantemente formada por polissacarídeo (zonas pretas) aparece dispersa numa fase contínua rica em proteína (zonas vermelhas). A morfologia da fase dispersa é claramente dependente do tipo de GM. Para a GG (Figura 3.34 B), GM mais ramificada, a fase dispersa surge essencialmente como gotas esféricas, observando-se o aumento do diâmetro e da polidispersidade no caso da GT (Figura 3.34 C). Nos sistemas contendo GA (Figura 3.34 D) surge uma microestrutura mais heterogénea, onde as regiões ricas em polissacarídeo apresentam uma morfologia assimétrica e de maiores dimensões

possivelmente como resultado da coalescência entre as gotas ricas em polissacarídeo, aproximando-se de um sistema bi-contínuo.

Assim, os resultados sugerem uma tendência para o progressivo aumento da extensão da fase rica em polissacarídeo com a diminuição do grau de ramificação o que possivelmente resulta do aumento dos fenómenos segregativos originados pela maior incompatibilidade termodinâmica entre IPS e GM com menor grau de ramificação. As GM com menor grau de ramificação apresentam maior tendência para estabelecer ligações intramoleculares e consequentemente formam agregados em maior número e/ou tamanho, o que possivelmente intensifica os processos segregativos entre proteína e polissacarídeo.

Em alguns casos, especialmente para a GM menos ramificada, com maior tendência para o estabelecimento de interações intermoleculares/ autoagregação, a microestrutura assemelha-se a uma dupla emulsão, onde a fase dispersa rica em polissacarídeo apresenta pequenas inclusões vermelhas correspondentes a proteína (Figura 3.34 D), as quais resultam de uma intensa separação de fases ficando aprisionadas na fase densa rica em polissacarídeo pelo que não estão acessíveis para sofrer coalescência com a fase predominantemente rica em proteína. Observações semelhantes estão descritas na literatura para biopolímeros (Clark *et al.*, 1983; Norton e Frith, 2001; Turgeon *et al.*, 2003; Cavallieri *et al.*, 2010). De acordo com Norton e Frith (2001) estas estruturas parecem surgir a partir de fenómenos secundários de separação de fases. Quando a separação ocorre, a determinada temperatura, as gotas iniciais são formadas e, com a diminuição da temperatura, a incompatibilidade entre biopolímeros aumenta, ocorrendo uma separação adicional dentro das próprias gotas em vez da difusão do polímero para as gotas já formadas. A estabilidade das porções dentro das gotas pode ser explicada pela baixa tensão superficial entre as fases na mistura de biopolímeros.

Aumentando a concentração de GM, a microestrutura dos sistemas IPS/GM foi drasticamente alterada (Figura 3.35). A microestrutura tipo emulsão observada para 10 % de IPS e 0.2 % de GM desapareceu e a 0.5% de GM observa-se uma microestrutura tipo agregada, onde a fase rica em proteína perdeu a interconetividade, originando uma microestrutura aparentemente bi-contínua. Assim, à medida que a concentração da GM aumentou, o tamanho da fase dispersa foi aumentando possivelmente por combinação das estruturas dispersas, observando-se a tendência para a ocorrência de inversão de fases, ou

seja, a fase contínua passa a ser formada predominantemente por polissacarídeo e a fase dispersa por proteína.

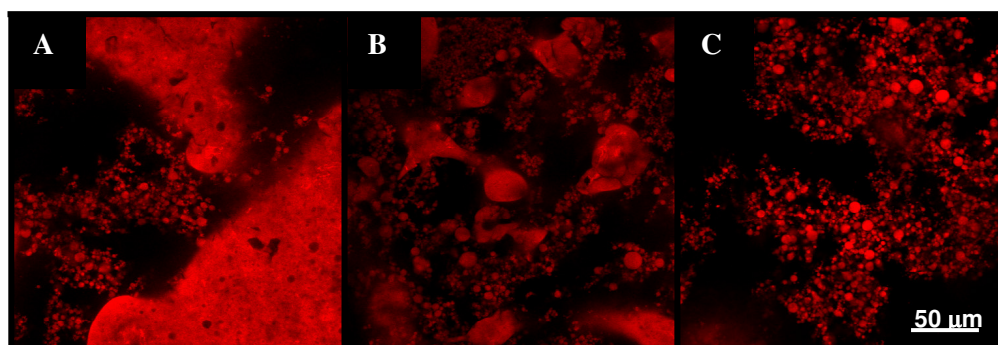


Figura 3.35- Imagens de CLSM dos géis de IPS 10 %, corados com *rodamina B*. (A) GG 0.5 %; (B) GT 0.5 % e (C) GA 0.5 %

O grau de ramificação foi determinante para a extensão da fase rica em proteína: à medida que diminuiu o grau de ramificação, a extensão da fase formada pela proteína decresceu e a descontinuidade da fase proteica claramente aumentou. Nas misturas contendo GG (Figura 3.35 A), ainda é possível observar a formação de uma fase constituída essencialmente por proteína de extensão e continuidade consideráveis embora existam porções proteicas que não integraram essa rede possivelmente devido à presença do polissacarídeo. Com a diminuição do grau de ramificação (Figura 3.35 B e C), diminui drasticamente a continuidade da fase proteica, sendo agora a fase contínua aquela mais rica em polissacarídeo, com a fase proteica dispersa, na forma de gotas mais ou menos esféricas na fase rica em polissacarídeo. Assim, com a diminuição do grau de ramificação das GM, e na concentração mais elevada de polissacarídeo, as gotas dispersas começaram a combinar-se desencadeando uma inversão de fases com uma nova fase contínua rica em polissacarídeo. Observações semelhantes foram descritas por Tavares *et al.* (2005) que estudaram o efeito das três GM na microestrutura de géis de isolado de proteínas de soro do leite. O comportamento descrito anteriormente foi menos pronunciado para a amostra de GG (GM mais ramificada), podendo este facto estar relacionado com um impedimento (possivelmente provocado pelas cadeias laterais de galactose, mais abundantes nas amostras de GG) para o estabelecimento de interações GM-GM, as quais possivelmente intensificam os processos de separação de fases.

De forma a confirmar que as regiões negras das imagens obtidas por microscopia confocal correspondiam ao polissacarídeo, preparou-se uma mistura IPS/GA de forma a corar diferencialmente a proteína, com rodamina B e o polissacarídeo com FITC. A Figura 3.36 ilustra a amostra duplamente corada, onde a proteína aparece a vermelho e o polissacarídeo a verde e confirma a presença do polissacarídeo nas zonas negras das imagens.

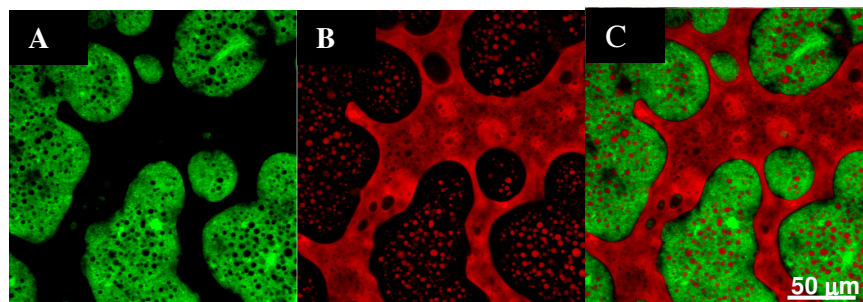


Figura 3.36- Imagens da microestrutura de uma mistura de 10% de IPS corado com rodamina B (zonas vermelhas) e 0.2% GA0 corada com FITC (zonas verdes). (A) - canal do FITC (488 nm); (B) - canal da rodamina B (561 nm); (C) - sobreposição de imagens

Para uma concentração de proteína de 6 %, para a qual se forma uma rede frágil, as alterações da microestrutura induzidas pela presença do polissacarídeo são diferentes mas também dependentes da concentração e tipo de GM (Figura 3.37). De um modo geral, observa-se microestruturas bi-contínuas, com interfaces difusas para as misturas com GT e GA a 0.2 %, observando-se uma separação de fases mais intensa com o aumento da concentração de GM ou decréscimo do grau de ramificação. Assim, para o sistema contendo a GA, para a qual ocorre maior agregação entre as suas cadeias em virtude do menor grau de ramificação, observa-se a inversão de fases com o aumento da concentração do polissacarídeo e uma redução visível da quantidade de proteína no campo de visão possivelmente por exclusão de volume em consequência da elevada incompatibilidade entre os biopolímeros. Com o aumento do grau de ramificação essa incompatibilidade decresce e, no caso da GT, forma-se uma matriz bicontínua. No caso da GG, onde ocorre menor agregação observa-se que a fase rica em polissacarídeo consegue encaixar-se no seio da fase rica em proteína, demonstrando menor incompatibilidade termodinâmica.

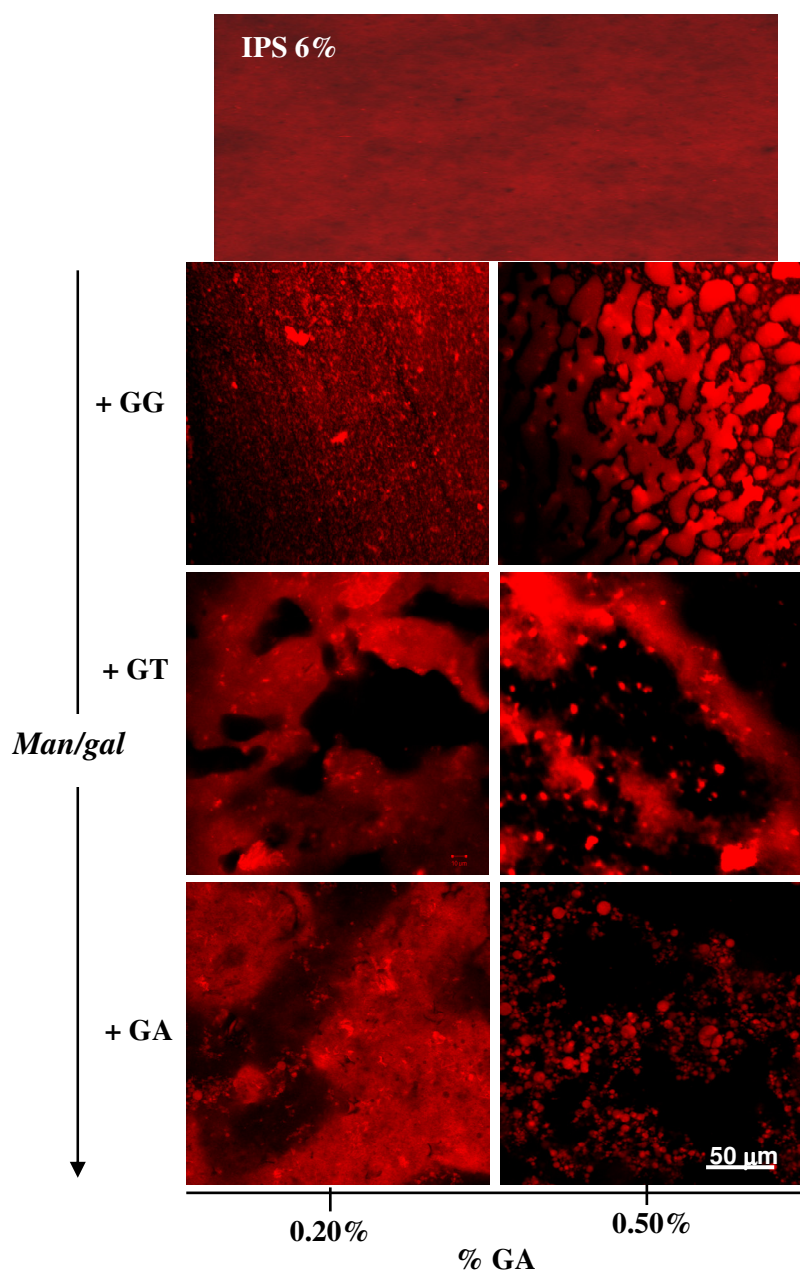


Figura 3.37- Imagens de CLSM de géis de misturas IPS + GM com diferentes graus de ramificação para uma concentração de proteína de 6 % e de GA de 0.2 % e 0.5 %.

A diversidade de microestruturas para sistemas mistos proteínas/polissacarídeos é frequentemente reportada na bibliografia e a sua ocorrência depende de diversos fatores, como estrutura, massa molecular, carga e concentração de cada polímero, propriedades do solvente e condições de mistura (tempo/temperatura). Por exemplo, misturas de gelatina/dextrano exibem separação de fases com morfologias distintas dependendo das

condições de tratamento tempo/temperatura (Tromp *et al.*, 2001), sistemas de proteínas do leite/GM podem apresentar microestruturas tipo emulsão e bi-contínuas (Bourriot *et al.*, 1999; Schorsch *et al.*, 1999), enquanto estruturas tipo agregadas surgem em misturas aquosas de proteínas do leite/dextranos ou amilopectina (De Bont *et al.*, 2002).

A relação entre os processos de separação de fases e de gelificação é bastante complexa e pode originar diferentes microestruturas. Quando a gelificação ocorre, o processo de separação de fases torna-se mais lento podendo mesmo parar, pelo que a microestrutura formada fica aprisionada na rede polimérica formada (Butler, 2002). Nos sistemas estudados, a cinética da separação de fases foi, provavelmente, influenciada pelo aumento da viscosidade promovida pela presença do polissacarídeo de elevada massa molecular, o que diminuiu a mobilidade molecular e consequentemente a velocidade da separação de fases, bem como pela tendência de autoassociação entre moléculas de cada um dos biopolímeros.

O processo de separação de fases aumenta a concentração local de cada biopolímero na correspondente fase, promovendo a autoassociação molecular contribuindo assim para a ocorrência de gelificação, mesmo a baixas concentrações proteicas, e para o aumento dos valores do módulo de armazenamento dos géis IPS/GM. Adicionalmente, espera-se que com a gelificação ocorra intensificação da separação de fases uma vez que a mistura de polissacarídeos com proteínas é menos favorável quando a proteína forma agregados (Tromp *et al.*, 1995) e, simultaneamente, a gelificação pode afetar a cinética da separação de fases devido sobretudo à redução de mobilidade das moléculas no sistema.

Por outro lado, é esperado que o grau de ramificação das amostras de GM adicionadas ao IPS influencie a capacidade de autoassociação, através de interações intermoleculares, essencialmente ligações de hidrogénio, entre os resíduos de manose, o que contribui para o aumento dos módulos viscoelásticos e para a microestrutura dos géis IPS/GM. As amostras de GM com maior razão man/gal, menor grau de ramificação, apresentaram maior tendência para sofrer autoassociação favorecendo os processos de segregação e maior concentração local de cada biopolímero resultando em valores superiores de G' e limites de gelificação inferiores para os sistemas mistos contendo GA. Contudo, para a maior concentração de polissacarídeo, a separação de fases pode ser tão intensa que as proteínas não formam um gel tridimensional verdadeiro, formando microdomínios densos nos quais podem ser estabelecidas fortes interações.

Contrariamente ao observado por Hua *et al.* (2003) os resultados obtidos demonstram um aumento dos módulos viscoelásticos dos sistemas mistos comparativamente com o IPS e uma extensa separação de fases entre os bioplímeros. Esta discrepância de resultados poderá estar relacionada com a aplicação de diferentes condições tempo/temperatura aos sistemas. Estes autores promoveram uma gelificação rápida (95 °C, em banho de água, por 30 min e arrefecimento até temperatura ambiente a uma taxa de variação não controlada) o que provavelmente favoreceu uma gelificação rápida, limitando o processo de *demixing* e consequentemente uma separação de fases menos extensa, obtendo-se géis com menor rigidez.

3.3.6.2 Efeito da massa molecular da galactomanana na gelificação do IPS

Nesta secção descreve-se o estudo do efeito da massa molecular de uma galactomanana sobre a microestrutura e propriedades reológicas de géis de IPS. Para isso, seleccionou-se a goma de alfarroba, aquela com menor grau de ramificação entre as anteriormente estudadas, por ter apresentado efeitos mais pronunciados sobre a gelificação do IPS. Por hidrólise enzimática controlada (realizada de acordo com o procedimento descrito na secção § 3.2.2.2) foram obtidas amostras de GA com diferentes massas moleculares e grau de ramificação semelhantes (amostras GA0-GA4, Tabela 3.3). O efeito da massa molecular nas propriedades gelificantes do IPS, a pH neutro e a baixa força iónica foi avaliado por ensaios dinâmicos de varrimento em temperatura (ensaios não isotérmicos), de varrimento em tempo (ensaios isotérmicos) e varrimentos em frequência. A microestrutura de todos os sistemas foi analisada por microscopia confocal de varrimento laser. Como anteriormente, foram avaliadas duas concentrações de cada uma das amostras de galactomanana (0.2 e 0.5 %) para duas concentrações de IPS (6 e 10 %).

3.3.6.2.1 Ensaios reológicos não isotérmicos

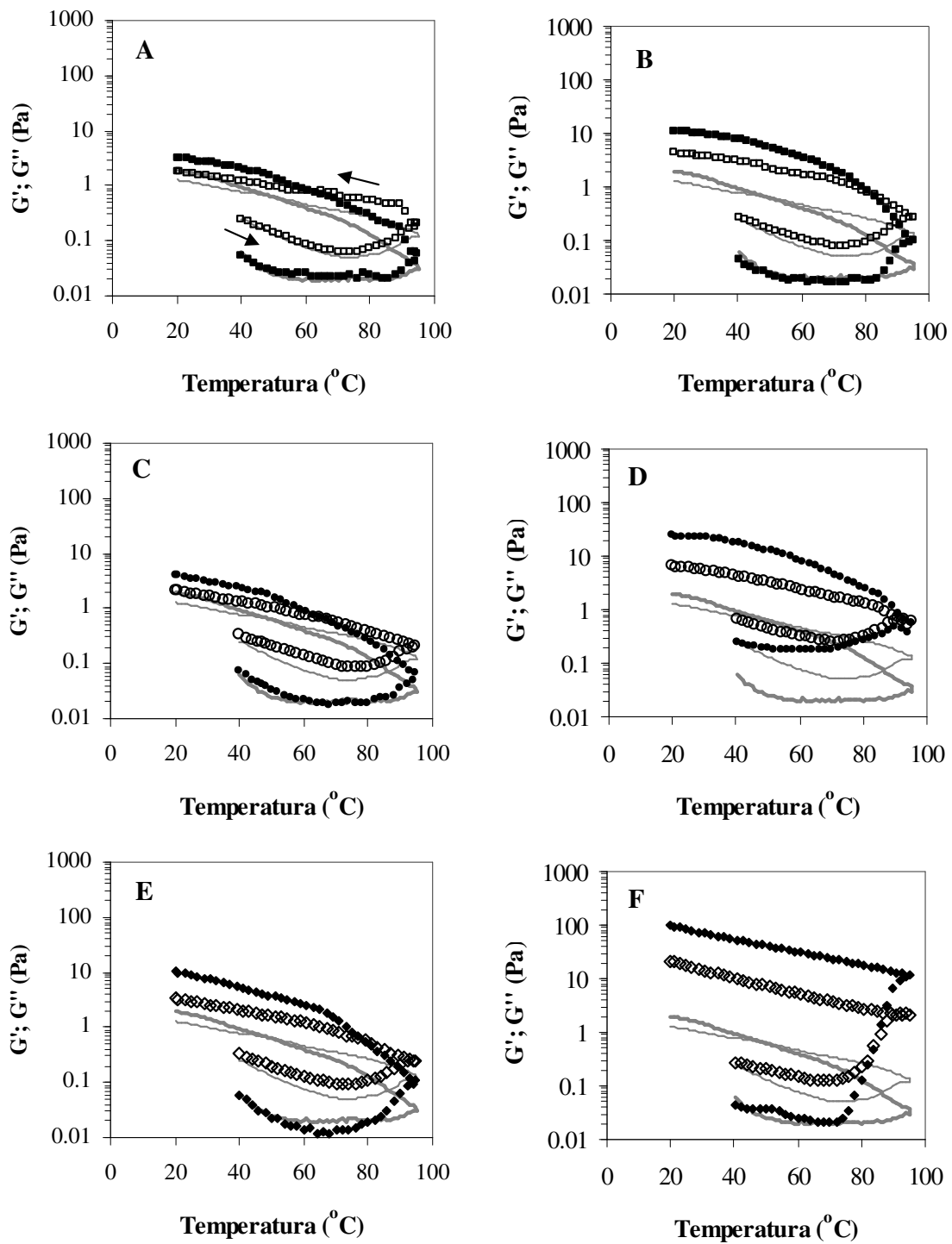
Foram realizados ensaios de varrimento de temperatura para as misturas IPS/GA contendo as amostras de GA com diferentes massas moleculares. Todas as amostras foram submetidas a um incremento controlado da temperatura de 40 a 95 °C (1 °C/min). Esta temperatura foi mantida por 10 min e depois diminuída, à mesma taxa, até 20 °C. De um

modo geral, o perfil de evolução dos módulos viscoelásticos seguiu o comportamento descrito para muitos biopolímeros (Monteiro *et al.*, 2005; Renkema e van Vliet, 2002; Tavares *et al.*, 2005) e já anteriormente descrito para as diferentes GM: No início da rampa ascendente de temperatura, o valor do módulo de perda foi superior ao módulo de armazenamento e, com o aquecimento, G' aumentou sendo a sua taxa de crescimento superior a G'' . A temperatura à qual se registou um substancial aumento dos módulos viscoelásticos, designada por temperatura de gelificação, foi sensível à concentração de IPS e à massa molecular da GA adicionada. Como já verificado para as misturas de IPS com as diferentes GM, durante o arrefecimento dos sistemas de 95 a 20 °C a rigidez do gel aumentou progressivamente, o que se traduziu num aumento monótono de G' e G'' com o decréscimo da temperatura, evidenciando a importância das ligações de hidrogénio na estrutura do gel.

Analisando a Figura 3.38 pode-se constatar que todas as amostras de GA adicionadas tiveram um efeito positivo na construção do gel, o que se traduziu em módulos viscoelásticos superiores aos dos sistemas de IPS sozinhos e em temperaturas de gelificação sensivelmente mais baixas. A amostra de GA 2 apresentou um efeito intermédio à GA 1 e 3 pelo que não foi representada nas figuras de forma a facilitar a sua interpretação.

Para todos os sistemas e independentemente da massa molecular observou-se o decréscimo inicial dos módulos viscoelásticos e constatou-se que, no início da experiência, G'' foi sempre superior a G' . O aumento acentuado dos módulos foi dependente da massa molecular da GA, sendo mais pronunciado com o aumento da massa molecular do polissacarídeo.

Os efeitos registados foram mais pronunciados para a maior concentração de GA adicionada. Para uma concentração de GA de 0.2 %, o cruzamento entre os módulos viscoelásticos apenas ocorreu na fase de arrefecimento dos sistemas mas com o aumento da concentração de GA, observou-se o cruzamento entre G' e G'' na fase de aquecimento, embora apenas para as misturas de IPS/GA contendo as duas amostras de GA de maior massa molecular (Figura 3.38 F e H).



(...)

Figura 3.38- Evolução dos módulos viscoelásticos (G' -símbolos fechados e linha cinzenta grossa e G'' - símbolos abertos e linha cinzenta fina) em função da temperatura (1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $\omega=5$ rad/s e 1% de deformação), de dispersões de IPS a 6% e misturas de IPS/GA, GA 0.2 % (A,C,E e G) e GA 0.5 % (B, D, F e H), para amostras de GM com diferentes massas moleculares: (A, B) GA4; (C,D) GA3; (E,F) GA1 e (G,H) GA0.

Continuação da Figura 3.38

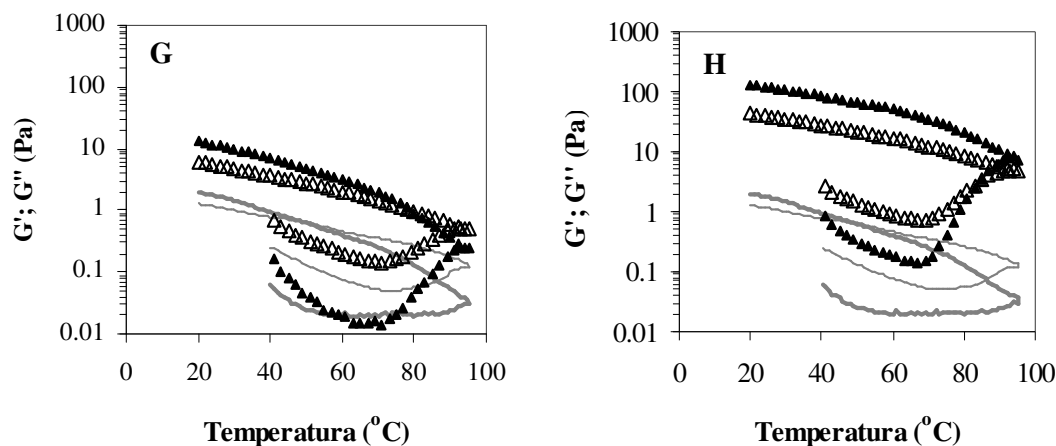
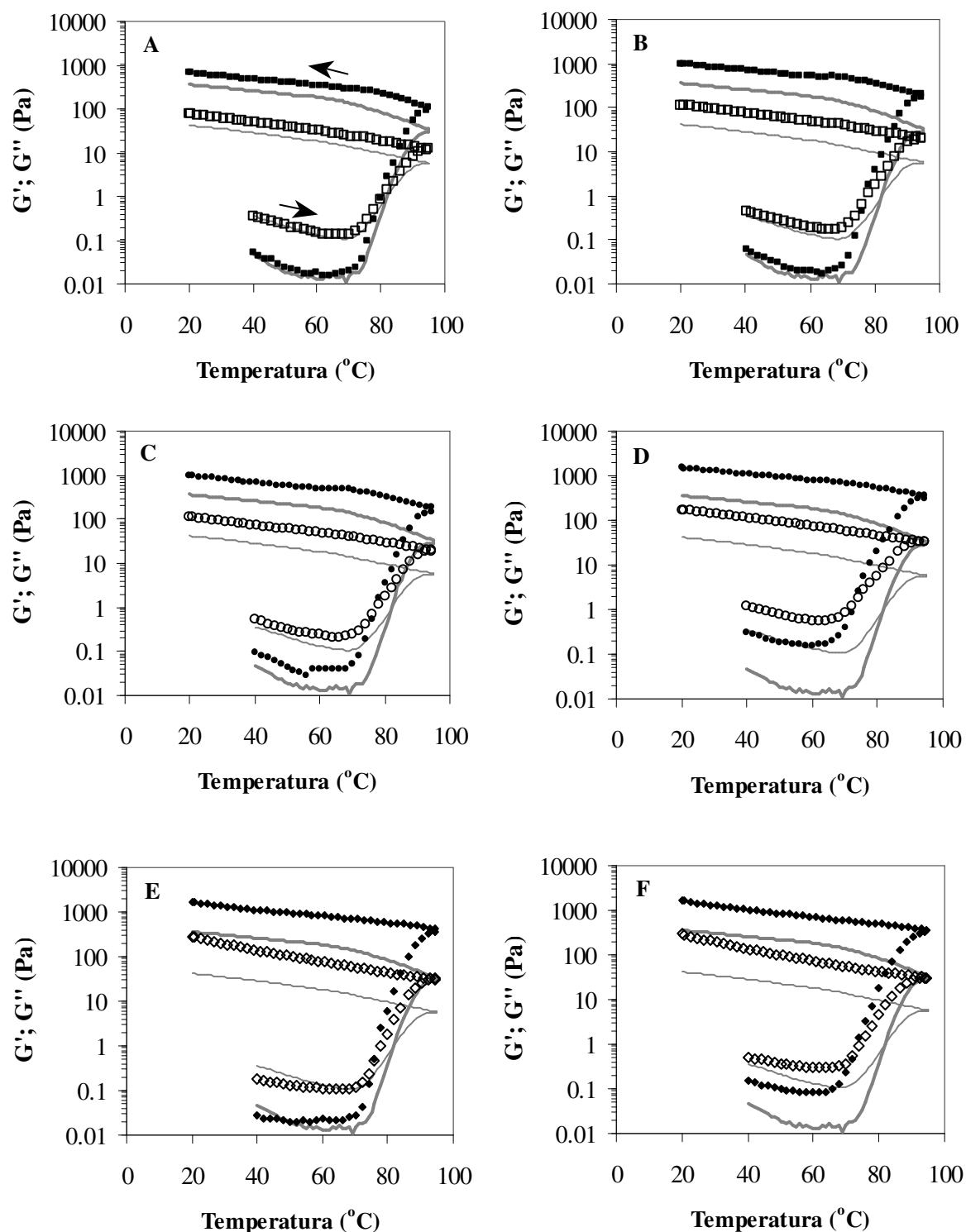


Figura 3.38- Evolução dos módulos viscoelásticos (G' -símbolos fechados e linha cinzenta grossa e G'' - símbolos abertos e linha cinzenta fina) em função da temperatura (1 °C/min, $\omega=5$ rad/s e 1% de deformação), de dispersões de IPS a 6% e misturas de IPS/GA, GA 0.2 % (A,C,E e G) e GA 0.5 % (B, D, F e H), para amostras de GM com diferentes massas moleculares: (A, B) GA4; (C,D) GA3; (E,F) GA1 e (G,H) GA0.

Foi também avaliado o efeito da massa molecular da GA em sistemas proteicos com concentração superior à concentração crítica de gelificação e que, por isso, por si só já conseguiam gelificar. A Figura 3.39 ilustra a evolução dos módulos viscoelásticos em função da temperatura, de dispersões de IPS e misturas de IPS/GA para a maior concentração de proteína estudada.

O efeito da adição de GM com diferentes massas moleculares a sistemas com concentração de proteína de 10 % é bastante monótono e reflete-se essencialmente a nível da temperatura de gelificação e valor dos módulos viscoelásticos, com a diminuição da primeira e o aumento dos módulos com o aumento da massa molecular da GA adicionada. O efeito da concentração da GA é igualmente sentida, intensificando os efeitos descritos. Para a maior concentração de GA adicionada, o sistema contendo a GA de maior massa molecular, GA0 (Figura 3.39 H), apresenta, no início da experiência, módulos viscoelásticos com valores muito próximos um do outro o que não se verifica nos restantes sistemas em estudo, tal como se comprova pelos valores de $\tan \delta$ próximos da unidade (Figura 3.40).

Este resultado salienta o carácter viscoso destes sistemas atribuído, possivelmente, pelas cadeias de GA de maior massa molecular.



(...)

Figura 3.39- Evolução dos módulos viscoelásticos (G' -símbolos fechados e linha cinzenta grossa e G'' - símbolos abertos e linha cinzenta fina) em função da temperatura ($1\text{ }^{\circ}\text{C/min}$, $\omega=5\text{ rad/s}$ e $1\text{ }\%$ de deformação), de dispersões de IPS a $10\text{ }\%$ e misturas de IPS/GA, GA $0.2\text{ }\%$ (A,C,E e G) e $0.5\text{ }\%$ (B, D, F e H), para amostras de GM com diferentes massas moleculares: (A, B) GA4; (C,D) GA3; (E,F) GA1 e (G,H) GA0.

continuação da Figura 3.39

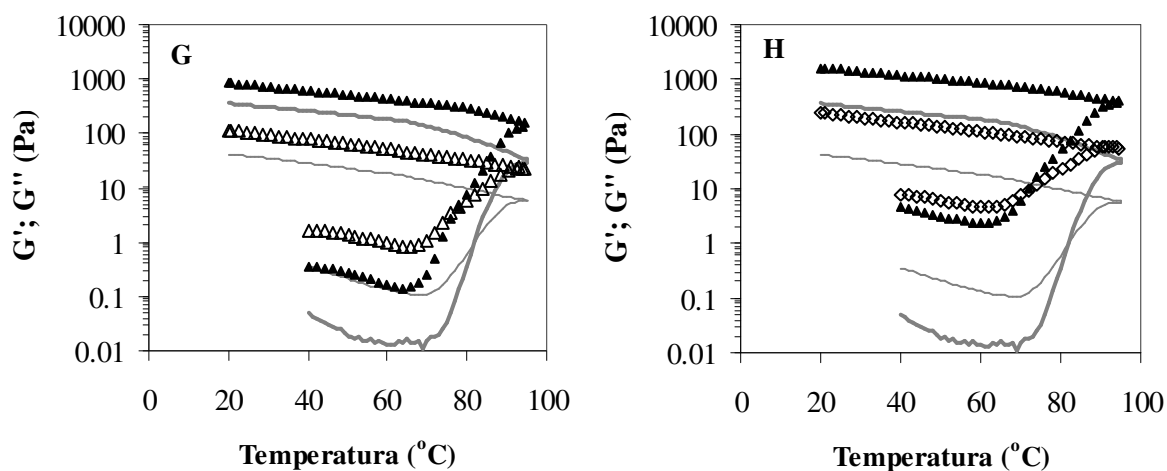


Figura 3.39- Evolução dos módulos viscoelásticos (G' -símbolos fechados e linha cinzenta grossa e G'' - símbolos abertos e linha cinzenta fina) em função da temperatura ($1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $\omega=5\text{ rad/s}$ e 1% de deformação), de dispersões de IPS a 10% e misturas de IPS/GA, GA 0.2% (A,C,E e G) e 0.5% (B, D, F e H), para amostras de GM com diferentes massas moleculares: (A, B) GA4; (C,D) GA3; (E,F) GA1 e (G,H) GA0.

Por outro lado, o sistema contendo a GA 4, de menor massa molecular, é o que apresenta maior diferença entre os valores iniciais de G' e G'' (Figura 3.39 B), assemelhando-se com o IPS sem GA até ao ponto de gelificação, a partir do qual se observa uma diferença entre estes sistemas com o crescimento mais acentuado dos módulos nos sistemas contendo a amostra de GA. Esta observação sugere que amostras de GA com massa molecular igual ou inferior a 149 kDa não exercem influência significativa nas propriedades viscoelásticas do IPS até ao ponto de gelificação em virtude do reduzido tamanho das suas cadeias. Contudo, o seu efeito começa a ser visível a partir do ponto de gelificação, reduzindo a temperatura de gelificação e aumentando o valor e a taxa de crescimento dos módulos viscoelásticos.

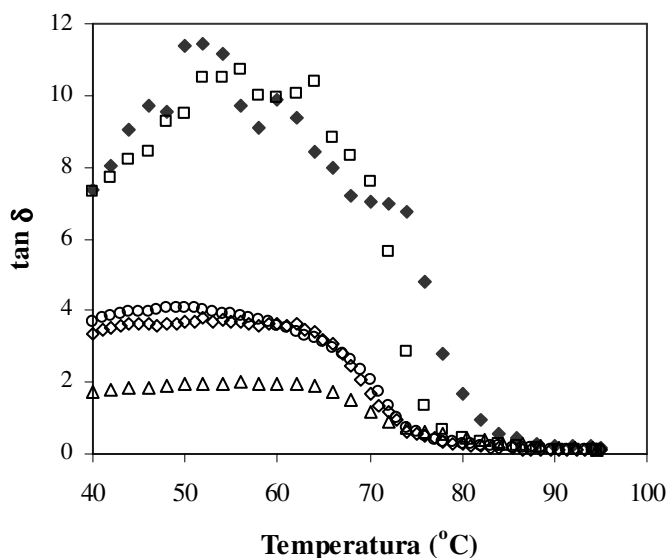


Figura 3.40 – Variação da tangente ao ângulo de perda com a temperatura (40-95°C) a 5 rad/s de sistemas contendo IPS a 10% (símbolos fechados) e sistemas mistos IPS/GA 0.5%: (\triangle) GA0; (\diamond) GA1; (\circ) GA3; (\square) GA4

Este resultado poderá estar relacionado com o facto da GA, mesmo com menor massa molecular, desencadear incompatibilidade termodinâmica, resultando na localização mais concentrada de cada um dos biopolímeros permitindo assim o aumento das interações entre cadeias proteicas e consequentemente uma gelificação mais rápida.

A Figura 3.41 esquematiza os efeitos da massa molecular da GA na temperatura de gelificação e no valor do módulo de armazenamento das dispersões de IPS medido a $\omega=5$ rad/s no fim da rampa de temperatura até 20 °C.

O aumento da massa molecular do polissacarídeo promoveu, para ambas as concentrações de GA adicionada, uma diminuição da temperatura de gelificação (T_{gel}). No que se refere ao efeito no valor do módulo de armazenamento, observou-se uma tendência para o aumento de G' com o aumento da massa molecular até 799 kDa (amostra GA 1) mas a adição da GA de maior massa molecular teve um efeito inverso, diminuindo o valor de G' comparativamente com a amostra GA 1. Este efeito da amostra GA 0 no valor de G' foi visível a ambas as concentrações de polissacarídeo estudadas.

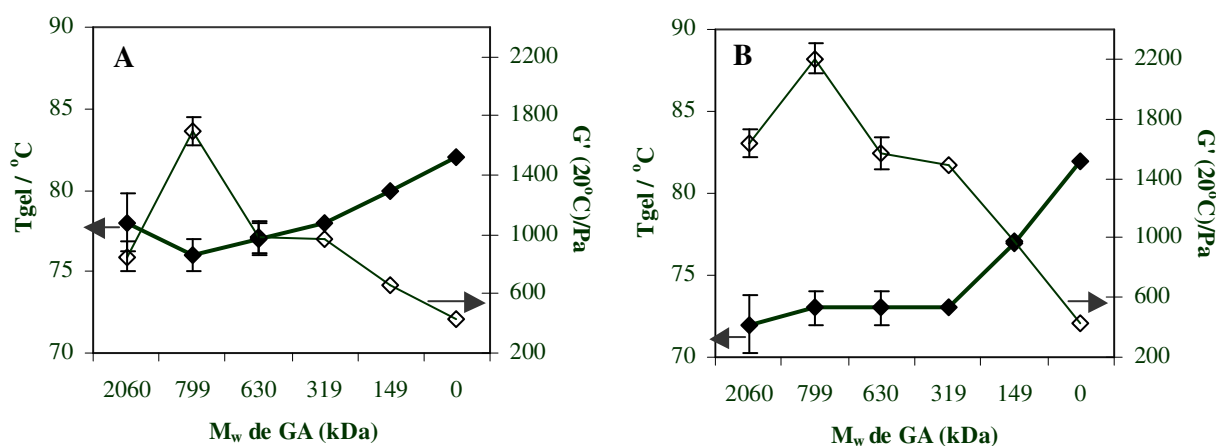


Figura 3.41 – Efeito da massa molecular das GM adicionadas (GA0-2060 kDa; GA1- 799 kDa; GA2- 630 kDa; GA3- 319 kDa; GA4-149 kDa) a IPS 10 %, pH 7, na temperatura de gelificação e nos valores do módulo de armazenamento a 20°C, medido no final da rampa de temperatura 40-95-20°C, a uma frequência de 5 rad/s e 1 % de deformação. (A) Sistema contendo 0.2 % de GA; (B) sistema contendo 0.5 % de GA

Foram obtidos os espectros mecânicos das misturas IPS/GM a 20 °C, no final das rampas descendentes de temperatura (Figura 3.42 e 3.43).

Para uma concentração de proteína de 6 %, todas as amostras de GA tiveram um efeito positivo nas propriedades viscoelásticas das dispersões de IPS uma vez que se observou um aumento generalizado dos módulos viscoelásticos e uma tendência para o decréscimo da dependência de G' e G'' com a frequência de oscilação.

Estes efeitos foram mais acentuados para a maior concentração do polissacarídeo e quanto maior a massa molecular da GA adicionada ao IPS. Para a menor concentração de GA adicionada (Figura 3.42 A), os sistemas comportaram-se como géis bastante frágeis com G' superior a G'' em toda a gama de frequências analisada mas com considerável dependência face à frequência, a qual aumentou para frequências maiores, ocorrendo uma aproximação entre os valores de G' e G'' .

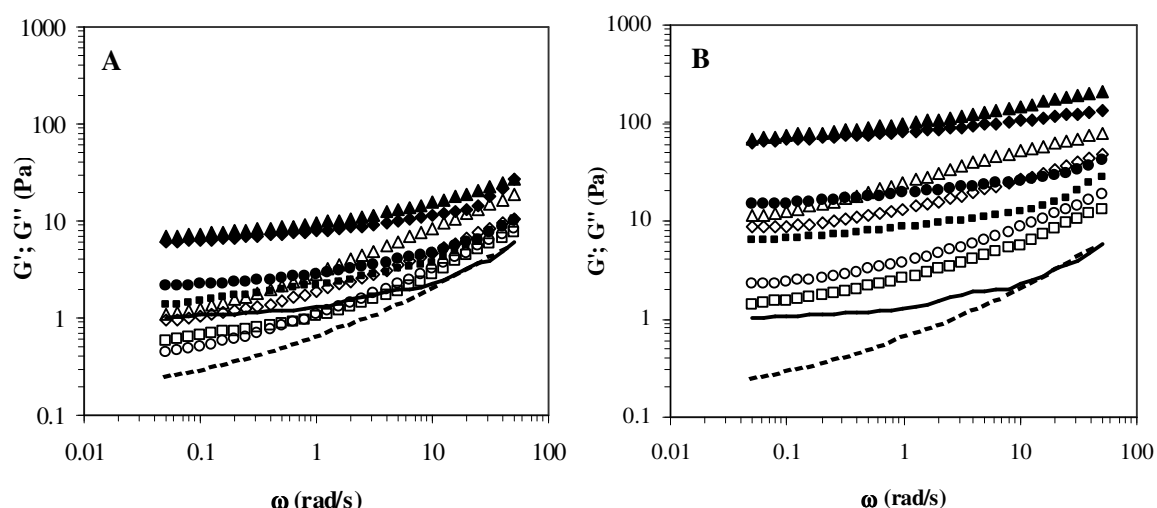


Figura 3.42- Espectros mecânicos (G' -símbolos fechados e linha a cheio; G'' - símbolos abertos e linha tracejada), a 20 °C, das misturas com concentração proteica de 6 % e GA com diferentes massas moleculares, a pH 7: (A) IPS + 0.2% GA (B) IPS + 0.5 % GA. ($\blacktriangle, \triangle$) GA0; (\blacklozenge, \lozenge) GA1; (\bullet, \circ) GA3; (\blacksquare, \square) GA4. As linhas correspondem aos sistemas de IPS sem galactomanana

Todavia, o caráter elástico predominou em todos os sistemas como se comprovou pelos valores de $\tan \delta$ sempre inferiores a 1 (resultados não apresentados). As amostras de GA 0 e 1 apresentaram efeitos semelhantes nas propriedades dos sistemas (a nível de evolução e valor dos módulos viscoelásticos) enquanto que os efeitos promovidos pela adição da GA 3 e 4 foram mais semelhantes entre si. Os valores da $\tan \delta$ corroboram estas afirmações.

Para a maior concentração de GA adicionada (Figura 3.42 B), os efeitos foram semelhantes embora ligeiramente mais intensos. Saliente-se que nestas condições, a variação de G' com a frequência dos sistemas contendo GA 3 afasta-se ligeiramente dos sistemas contendo GA 4 exibindo este último módulos viscoelásticos inferiores e maior dependência face à frequência, principalmente a valores mais elevados de frequência.

Para uma concentração de proteína de 10 % (Figura 3.43), também se verificou um efeito da massa molecular da GA sobre as propriedades viscoelásticas de IPS, observando-se um ligeiro aumento da rigidez do sistema com o aumento da massa molecular da GA. O aumento da concentração da GA para 0.5 % (Figura 3.43 B), aproximou o valor dos módulos viscoelásticos dos sistemas contendo as GA 0, GA 1 e GA 2 demonstrando um aumento do caráter viscoso desses sistemas atribuído essencialmente às características estruturais (maior massa molecular) das amostras de GA em questão. A mistura com a

amostra de GA de menor massa molecular foi a que apresentou menor rigidez como se pode observar pelos valores inferiores de G' e G'' .

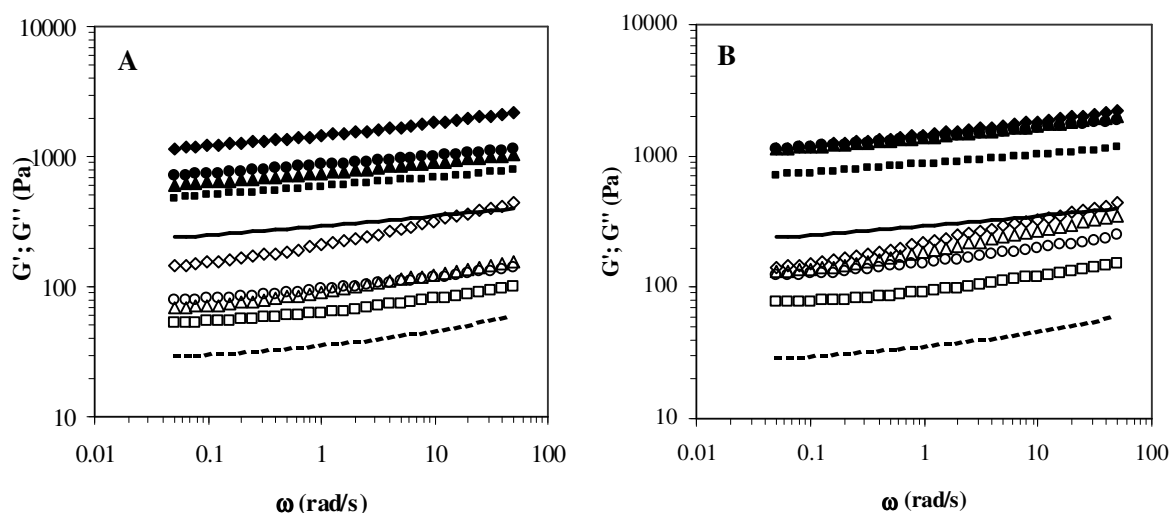


Figura 3.43- Espectros mecânicos (G' -símbolos fechados e linha a cheio; G'' - símbolos abertos e linha tracejada), a 20 °C, das misturas com concentração proteica de 10 % e GA com diferentes massas moleculares, a pH 7: (A) IPS + 0.2% GA (B) IPS + 0.5 % GA. ($\blacktriangle, \triangle$) GA0; (\blacklozenge, \lozenge) GA1; (\bullet, \circ) GA3; (\blacksquare, \square) GA4. As linhas correspondem aos sistemas de IPS sem galactomanana

Para os sistemas em estudo, determinou-se o valor da constante M (equação 3.7), associada à dependência de G' com a frequência de oscilação. Contudo, para a concentração de proteína de 6 %, o comportamento dos sistemas não se ajustou à lei de potência para toda a gama de frequências estudada tendo sido, por isso, definidos dois declives.

A determinação da constante M (Tabela 3.7) por aplicação da lei de potência aos sistemas em estudo mostrou que o aumento da concentração da proteína diminuiu os valores da constante M sugerindo um aumento do carácter elástico. Para a concentração de proteína mais elevada (10 % de IPS), a presença da GA contribuiu para a elasticidade do sistema diminuindo o valor de M , sendo este decréscimo tanto mais acentuado quanto maior a massa molecular da goma. O mesmo não acontece para 6 % de concentração de proteína, onde se verifica que, de um modo geral, a GA aumentou os valores de M , evidenciando o carácter viscoso mais acentuado destes sistemas. Este aumento é menos forte para o sistema contendo a GA de maior massa molecular. A uma concentração de proteína de 6 %, observou-se que o valor de M a frequências mais elevadas (m_2) é maior do que para valores

mais baixos de frequências, significando que em escalas de tempo pequenas os sistemas considerados permitem a ocorrência de mais rearranjos moleculares.

Tabela 3.6 – Valores da constante M , a 20 °C, dos sistemas contendo IPS a 6% e 10 % e sistemas mistos contendo amostras de GA com diferentes massas moleculares a 0.2% e 0.5%.

$m1$ - valores de M determinados para frequências mais baixas; $m2$ - valores de M para frequências mais elevadas

[IPS]	6%				10%	
Sistema	0.20%		0.50%		0.20%	0.50%
	$m1$	$m2$	$m1$	$m2$		
IPS/GA0	0.151 ± 0.014	0.378 ± 0.087	0.140 ± 0.014	0.210 ± 0.045	0.078 ± 0.003	0.084 ± 0.004
IPS/GA1	0.117 ± 0.021	0.680 ± 0.024	0.091 ± 0.009	0.163 ± 0.022	0.092 ± 0.002	0.097 ± 0.001
IPS/GA2	0.147 ± 0.032	0.704 ± 0.015	0.105 ± 0.005	0.295 ± 0.017	0.070 ± 0.006	0.075 ± 0.003
IPS/GA3	0.155 ± 0.009	0.104 ± 0.036	0.108 ± 0.011	0.314 ± 0.069	0.070 ± 0.005	0.073 ± 0.004
IPS/GA4	0.199 ± 0.011	0.687 ± 0.024	0.129 ± 0.007	0.567 ± 0.031	0.070 ± 0.002	0.070 ± 0.007
IPS	$m1 = 0.076 \pm 0.019$; $m2 = 0.373$					

No seguimento dos ensaios descritos, foram realizados varrimentos em deformação dos sistemas contendo as diferentes GA em análise (Figura 3.44).

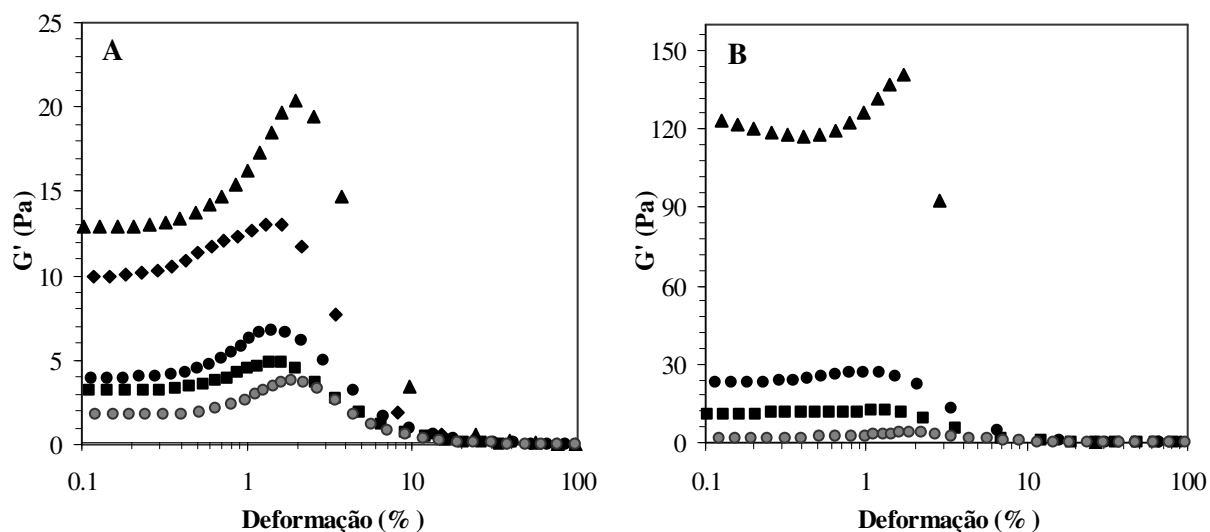


Figura 3.44- Varrimento em deformação ($\omega = 5$ rad/s, 20 °C) dos sistemas IPS e IPS/GA com diferentes massas moleculares, para uma concentração de proteína de 6 % e 0.2 % de GA (A) e 0.5% de GA (B). ($\blacktriangle, \triangle$) GA0; (\blacklozenge, \lozenge) GA1; (\bullet, \circ) GA3; (\blacksquare, \square) GA4. Símbolos cinzentos correspondem aos sistemas de IPS sem galactomanana

Os resultados mostram que a adição de 0.2 % de GA não provocou alterações significativas na zona de comportamento linear comparativamente com o IPS sem polissacarídeo (Figura 3.44-A). Contudo, a adição da GA 0, amostra de polissacarídeo de maior massa molecular, à maior concentração adicionada (0.5 %) resultou na diminuição da zona de comportamento linear (Figura 3.44-B).

3.3.6.2.2 Ensaios reológicos isotérmicos

Realizaram-se também ensaios de maturação isotérmica a 80 °C para as dispersões de IPS e das misturas IPS/GA com diferentes massas moleculares, determinando-se a evolução temporal das propriedades viscoelásticas, nomeadamente, a evolução ao longo do tempo do módulo de armazenamento e do módulo de perda, conforme apresentado na Figura 3.45. Durante a cinética de maturação, e para a menor concentração de GA ensaiada (Figura 3.45 A), o único sistema que se distinguiu foi a mistura IPS/GA0, contendo a GA de maior massa molecular; todos os outros apresentaram módulos muito baixos, perto do ruído do aparelho e do seu limite de sensibilidade.

Para esse sistema observou-se já uma evolução bem definida dos módulos viscoelásticos, com predomínio do caráter sólido em que G' foi superior a G'' desde os primeiros minutos da experiência, embora o valor dos módulos seja relativamente pequeno, o que denota a fragilidade do gel formado. A evolução da tangente ao ângulo de perda (Figura 3.46 A) foi bem definida e registou-se uma ligeira diminuição dos seus valores com o decorrer do tempo, o que evidencia o aumento do caráter elástico do sistema. Por outro lado, os módulos viscoelásticos assim como os da $\tan \delta$ do IPS e dos restantes sistemas mistos apresentaram uma variação ao longo do tempo, muito irregular e próximos do ruído do instrumento.

O valor de $\tan \delta$ de todos os sistemas, misturas IPS/GA e IPS, para a menor concentração de GA, embora muito afetado por erros devido aos baixos valores dos módulos viscoelásticos e à falta de sensibilidade do reómetro para os medir, apresentaram valores inferiores a 1 (Figura 3.46) mostrando uma tendência para a prevalência do caráter elástico destes sistemas numa cinética de 3 h. Infere-se ainda, que nas condições anteriormente referidas, apenas a amostra de GA de maior massa molecular apresentou um efeito positivo nas propriedades viscoelásticas dos sistemas finais.

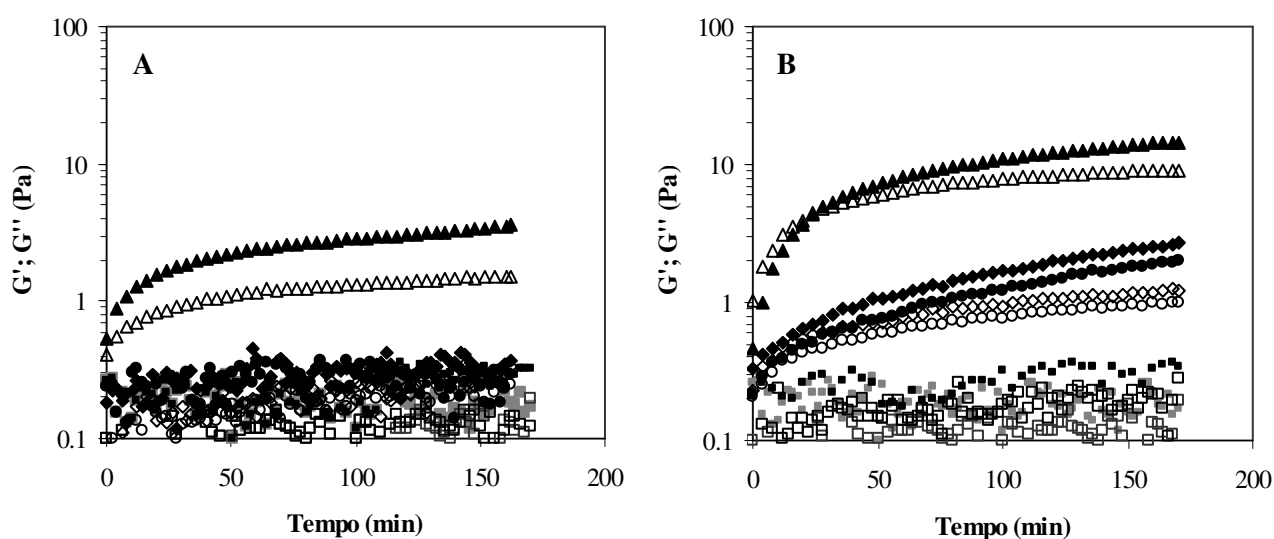


Figura 3.45- Variação dos módulos viscoelásticos (G' -símbolos fechados; G'' - símbolos abertos) durante as experiências de cura a 80 °C para os sistemas com 6 % de IPS e GA a 0.2 % (A) e 0.5 % (B), a pH 7, com diferentes massas moleculares de GA: ($\blacktriangle, \triangle$) GA0; (\blacklozenge, \lozenge) GA1; (\bullet, \circ) GA3; (\blacksquare, \square) GA4. Símbolos cinzentos correspondem aos sistemas de IPS sem galactomanana

O aumento da concentração da GA (Figura 3.45 B) traduziu-se num aumento dos módulos viscoelásticos e numa influência mais evidente da massa molecular do polissacarídeo.

À exceção do sistema misto contendo a GA 4, de menor massa molecular, os restantes sistemas distinguiram-se do IPS sem GA, quer pelos maiores valores dos módulos viscoelásticos quer pela evolução bem definida de G' e G'' assim como das suas $\tan \delta$ (Figura 3.46 B). A evolução da $\tan \delta$ do sistema IPS/GA0 com o tempo de experiência, foi relativamente diferente da observada para as misturas contendo as amostras GA 1 e 3: para o primeiro, a $\tan \delta$ assumiu valores superiores a um até aproximadamente 210 min de experiência, significando que o caráter viscoso predominou no início da cinética, devido à presença do polissacarídeo não gelificante de elevada massa molecular.

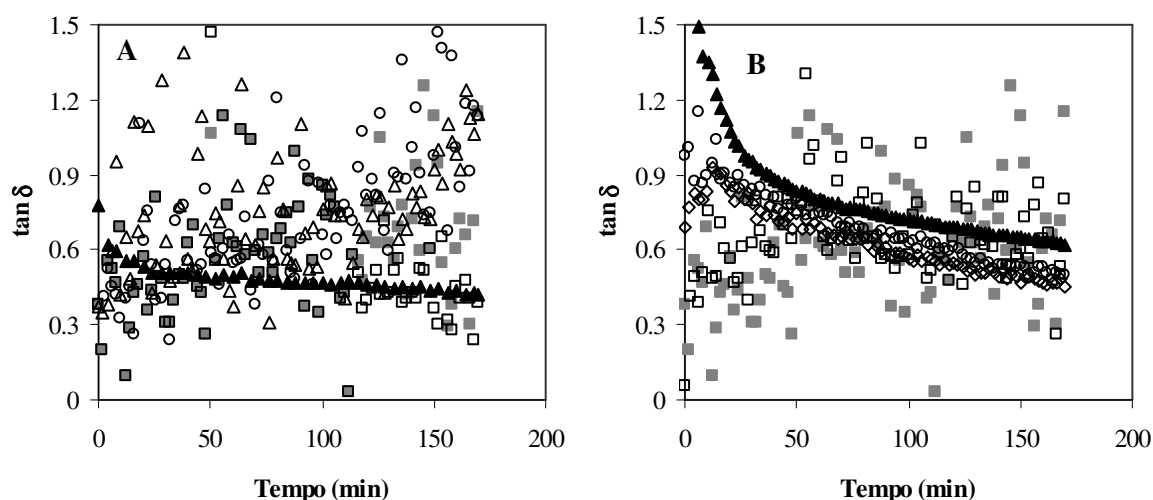


Figura 3.46- Variação da tangente ao ângulo de perda ($\tan \delta$) durante as experiências de cura a 80 °C para os sistemas com 6 % de IPS e GA a 0.2 % (A) e 0.5 % (B), a pH 7, com diferentes massa molecular de GA: (▲) GA0; (◇) GA1; (○) GA3; (□) GA4. Símbolos cinzentos correspondem aos sistemas de IPS sem galactomanana

Contudo, observa-se um decréscimo progressivo dos valores da $\tan \delta$ o que revela o aumento do caráter elástico do sistema com o tempo por incorporação de uma maior quantidade de moléculas proteicas na rede tridimensional, provavelmente associada a um aumento da extensão da separação de fases entre os dois polímeros e ao aumento da concentração proteica na fase dispersante. Para as misturas IPS/GA1 e 3, a $\tan \delta$ assumiu valores sempre inferiores, registrando-se um aumento dos seus valores durante os primeiros minutos do ensaio (≈ 12 min), ocorrendo, a partir desse momento, um decréscimo progressivo dos valores da $\tan \delta$. Estes resultados traduzem o claro efeito da massa molecular do polissacarídeo nas propriedades viscoelásticas do sistema misto durante a maturação, mas sugerem também a complexidade da ocorrência, durante este ensaio, quer da desnaturação proteica e da gelificação das proteínas, quer da separação de fases entre os dois biopolímeros.

O tempo de gelificação (t_{gel}), tempo para o qual ocorre o cruzamento entre G' e G'' , foi influenciado pela massa molecular do polissacarídeo: para uma massa molecular de 2060 kDa (GA0), G' e G'' cruzaram-se ao fim de 27 min, enquanto que para as amostras de GA com massa molecular inferior ou igual a 800 kDa o cruzamento ocorreu em menos de 1 min. Interessante foi ainda verificar que para a maior concentração de GA adicionada, o t_{gel} da mistura IPS/GA1 foi consideravelmente superior ao registado para a referida mistura

com a menor concentração de polissacarídeo: no primeiro caso, foram necessários 27 min para G' se tornar superior a G'' enquanto que no segundo caso G' foi desde o início da experiência superior a G'' , sugerindo que a partir de determinada concentração de polissacarídeo, uma amostra de GA com massa molecular elevada desfavorece a proximidade e interação entre as cadeias proteicas, aumentando assim o tempo de gelificação e o caráter viscoso dos sistemas, como se pode constatar pelo elevado valor de $\tan \delta$ destas misturas (Figura 3.46 B). De um modo geral, a diminuição da massa molecular aumentou o caráter elástico dos sistemas corroborando assim as informações obtidas pelos varrimentos em temperatura.

Os perfis de evolução de G' e G'' das misturas IPS/GA1 e IPS/GA3 mostraram grandes semelhanças, tal como já tinha sido descrito na evolução temporal dos valores de $\tan \delta$, embora o decréscimo da massa molecular da GA promova uma ligeira tendência para a diminuição do valor dos módulos viscoelásticos.

Para uma concentração de proteína de 10 % (Figura 3.47), não se registaram grandes alterações nos perfis de evolução dos módulos viscoelásticos nem dos valores de $\tan \delta$ (Figura 3.48) em função da massa molecular da galactomanana: no início do ensaio, ocorreu um aumento acentuado dos módulos seguido de uma fase de variação menos acentuada. G' foi sempre superior a G'' ao longo das 3 h de ensaio. Apesar da similaridade dos valores de G' e G'' dos sistemas IPS com as amostras de GA 0, 1 e 3, o efeito da massa molecular fez-se sentir essencialmente no valor do módulo de perda, sugerindo que a massa molecular da GA contribuiu predominantemente para alterar o caráter viscoso dos sistemas, o qual é diminuído com o decréscimo da massa molecular do polissacarídeo adicionado.

A mistura IPS/GA4 distinguiu-se, para ambas as concentrações de GA, das restantes misturas em análise pelos valores inferiores de G' e G'' . Mais uma vez, o aumento da concentração da GA adicionada promoveu, como era de esperar, o aumento dos módulos viscoelásticos. Com o aumento da concentração de proteína observou-se uma diminuição dos valores da $\tan \delta$, sendo este efeito mais sentido com a GA de maior massa molecular (Figuras 3.46 e 3.48).

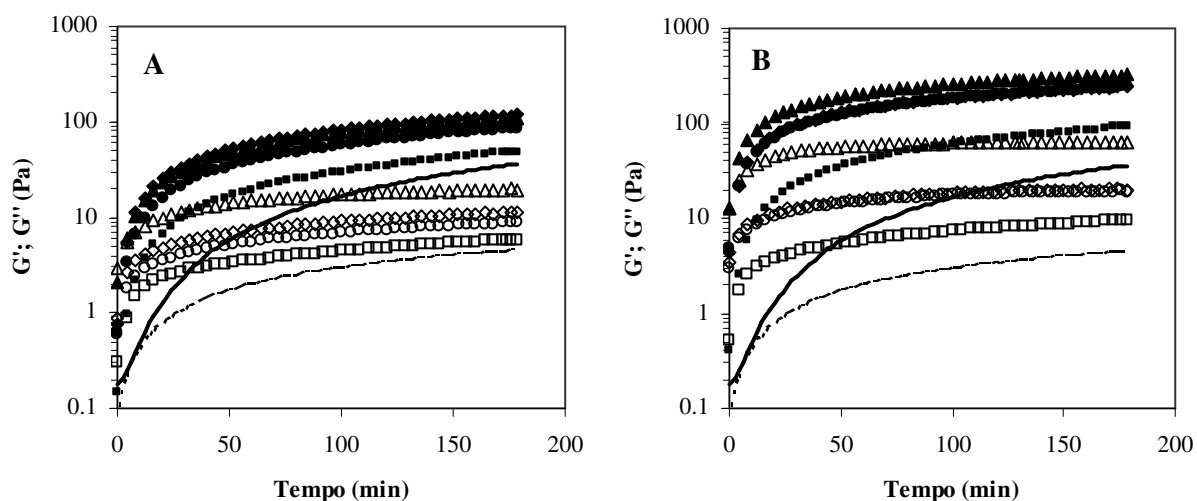


Figura 3.47- Variação dos módulos viscoelásticos (G' -símbolos fechados e linha grossa; G'' -símbolos abertos e linha fina) durante as experiências de cura a 80 °C para os sistemas com 10 % de IPS e GA a 0.2 % (A) e 0.5 % (B), a pH 7. ($\blacktriangle, \triangle$) GA0; (\blacklozenge, \lozenge) GA1; (\bullet, \circ) GA3; (\blacksquare, \square) GA4. As linhas correspondem aos sistemas de IPS sem galactomanana

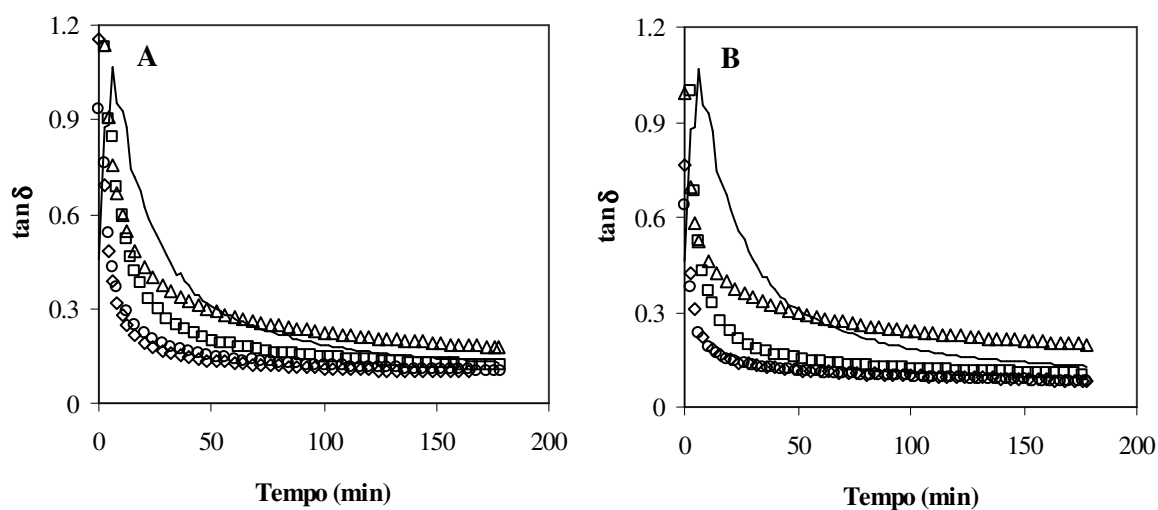


Figura 3.48- Variação da tangente ao ângulo de perda ($\tan \delta$) durante as experiências de cura a 80 °C para os sistemas com 10 % de IPS e GA a 0.2 % (A) e 0.5 % (B), a pH 7. (\triangle) GA0; (\lozenge) GA1; (\circ) GA3; (\square) GA4. As linhas correspondem aos sistemas de IPS sem galactomanana

Após maturação durante 3 h a 80 °C, como esperado, verificou-se uma dependência do comportamento viscoelástico dos géis obtidos, quer relativamente à massa molecular quer à concentração da GA.

A Figura 3.49 ilustra a variação dos módulos viscoelásticos com a frequência de oscilação em função da massa molecular e da concentração da GA adicionada a IPS. Os espectros mecânicos dos sistemas em estudo corroboraram os resultados das cinéticas de maturação. De um modo geral a GA, em toda a gama de massas moleculares analisadas, teve um efeito positivo nas propriedades viscoelásticas do IPS, aumentando o valor dos módulos viscoelásticos e diminuindo a dependência destes face à frequência de oscilação, como anteriormente verificado para os ensaios não isotérmicos, embora com algumas exceções como se mostra na Tabela 3.8. Para uma concentração de proteína de 6 %, observa-se uma elevada dependência de G' e G'' com a frequência e, para o IPS e sistema misto contendo a GA de menor massa molecular, G'' é superior a G' ocorrendo o cruzamento apenas a altas frequências, denotando um comportamento típico de um fluido viscoelástico com concentração abaixo da transição sol-gel. Os sistemas IPS/GA1 e IPS/GA3 apresentaram propriedades viscoelásticas semelhantes entre si, com uma diminuição da dependência dos módulos face à frequência e G' próximo a G'' ao longo de toda a gama de frequências analisada. O sistema contendo a GA de maior massa molecular foi o que mais se distinguiu pelos valores mais elevados dos módulos e menor dependência face à frequência mas também por G' ser sempre superior a G'' na gama de frequências analisada. Contudo, a proximidade entre os valores dos módulos mostra que o gel formado é pouco rígido e de elevado carácter viscoso. O aumento da concentração da GA adicionada intensificou os efeitos descritos anteriormente (Figura 3.49 B). Em geral, a diminuição da massa molecular da GA adicionada diminuiu o carácter elástico dos sistemas como pode ser observado pelo aumento da constante M (Tabela 3.8), enquanto o aumento da concentração do polissacarídeo, à exceção da GA de maior massa molecular (GA0), provocou uma considerável diminuição dos valores de M , ou seja o aumento do carácter elástico dos sistemas. No caso da GA0, observou-se o efeito inverso: com o aumento da concentração de GA, o valor de M aumentou, pelo que se infere que esta amostra de GA intensifica o carácter viscoso do sistema, apesar de aumentar G' .

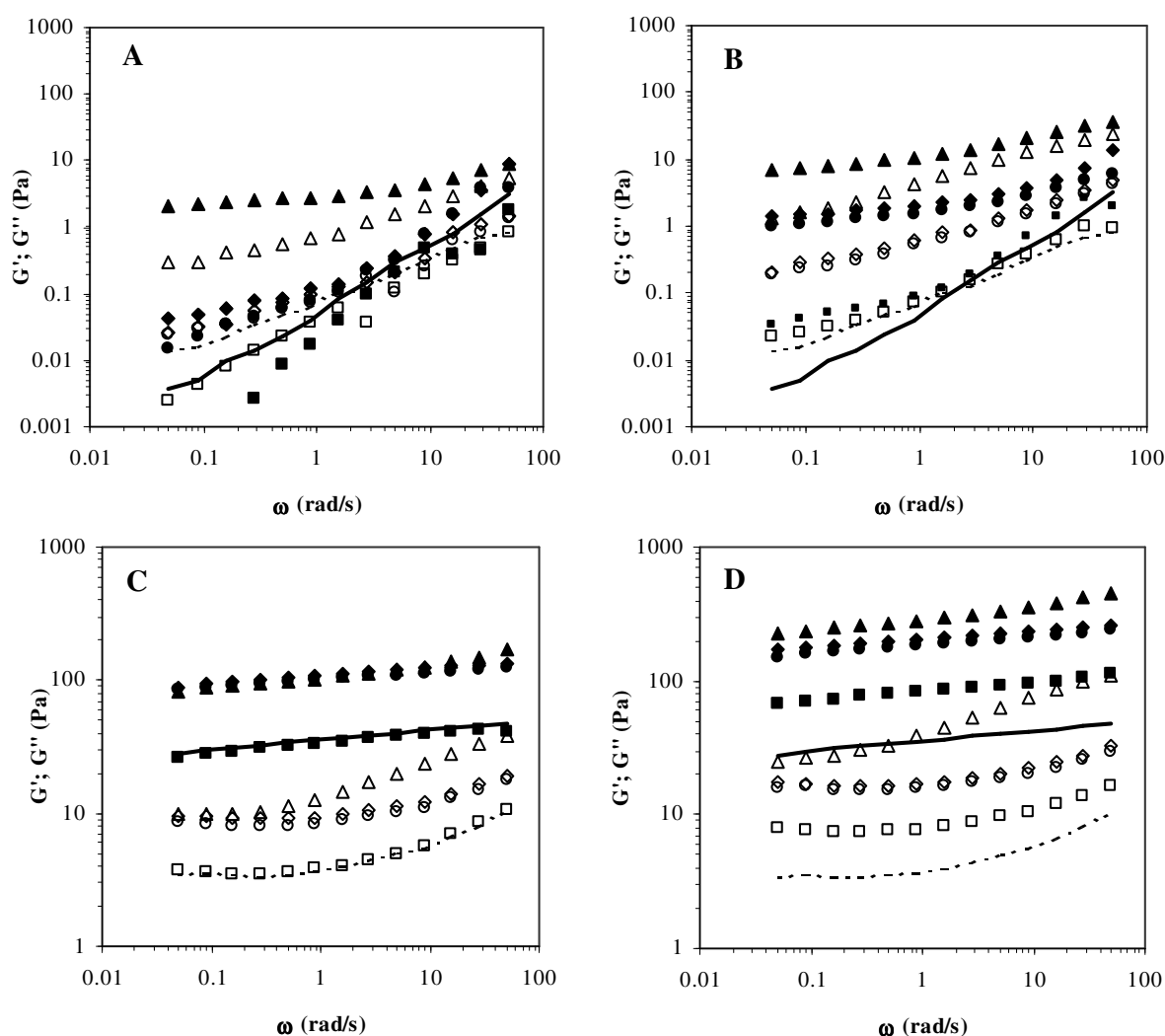


Figura 3.49- Espectros mecânicos a 80 °C para os sistemas com uma concentração de proteína de 6 % (A e B) e 10 % (C e D) e GM e concentração de GA de 0.2 % (A e C) e 0.5 % (B e D), a pH 7, obtidos após as experiências isotérmicas (G' -símbolos fechados e linha a cheio; G'' - símbolos abertos e linha tracejada). ($\blacktriangle, \triangle$) GA0; (\blacklozenge, \lozenge) GA1; (\bullet, \circ) GA3; (\blacksquare, \square) GA4. As linhas correspondem aos sistemas de IPS sem galactomanana

O efeito da massa molecular da GA é mais pronunciado nos sistemas com menor concentração de proteína.

Para uma concentração de proteína de 10 %, todos os sistemas em estudo, quer o IPS sem GA, quer os quatro sistemas mistos, apresentaram características de géis predominantemente elásticos estabelecidos por ligações não covalentes entre as moléculas (Ross-Murphy, 1984) com G' sempre superior a G'' em cerca de uma década e com valores de M entre 0.05 e 0.1 (Tabela 3.8), característicos de géis predominantemente elásticos. Por outro lado, a adição de GA permitiu obter géis mais rígidos. Contudo, a diferença entre as massas moleculares das amostras de GA, na gama entre 2000 e 300 kDa,

pouco se refletiu nas propriedades viscoelásticas dos sistemas, principalmente na menor concentração de polissacarídeo.

Tabela 3.8- Valores da constante M , a 80 °C, para os sistemas em estudo

[IPS]	6%		10%	
[GM]	0.20%	0.50%	0.20%	0.50%
IPS/GA0	0.196	0.247	0.095	0.097
IPS/GA1	0.738	0.284	0.059	0.058
IPS/GA2	0.796	0.275	0.058	0.060
IPS/GA3	0.831	0.254	0.055	0.064
IPS/GA4	1.264	0.670	0.071	0.071
IPS	0.994 ± 0.008		0.075 ± 0.007	

Registe-se que G'' apresentou maior dependência face à frequência que G' , principalmente a altas frequências, sendo esta dependência função da massa molecular da GA. O aumento da concentração da GA permitiu diferenciar, ainda que ligeiramente, as amostras de GA, aumentando os módulos viscoelásticos com o aumento da massa molecular.

Os módulos viscoelásticos do sistema contendo a GA0 apresentaram maior dependência face à frequência do que os das restantes misturas e do que a mesma mistura mas com menor concentração de GA demonstrando uma vez mais que a massa molecular da GA influencia fortemente a componente viscosa da GA e consequentemente dos sistemas onde foi inserida.

3.3.6.2.3 Microscopia confocal de varrimento laser

De forma semelhante ao realizado para o estudo do efeito do grau de ramificação da galactomanana, realizaram-se ensaios de microscopia confocal de varrimento laser, com o objetivo de relacionar as propriedades reológicas dos sistemas em estudo com as respetivas microestruturas. A Figura 3.50 ilustra a microestrutura das amostras com IPS a 10 % em função da concentração e massa molecular da GA. A imagem de CLSM do gel de IPS revelou uma estrutura homogênea e densa, com uma fluorescência distribuída regularmente, enquanto que para os sistemas mistos observou-se uma evidente separação

de fases, uma contendo predominantemente proteína e a outra o polissacarídeo, independentemente da concentração e massa molecular da GA.

A extensão da separação de fases revelou ser dependente da massa molecular e da concentração do polissacarídeo. As imagens referentes às misturas contendo a menor concentração de GA mostram a existência de gotículas essencialmente esféricas, ricas em polissacarídeo, dispersas na fase contínua, essencialmente formada por proteína. À medida que a massa molecular da GA aumentou, o tamanho dessas gotículas dispersas foi aumentando e alterou-se a sua forma, possivelmente por coalescência, sem no entanto, ocorrer inversão de fases. Para uma determinada massa molecular, o aumento da concentração da GA adicionada promoveu o aumento da fase rica em polissacarídeo e consequentemente acentuou o processo de separação de fases. Para além do progressivo aumento da fase dispersa, o aumento da massa molecular da GA leva ao aparecimento de fases bicontínuas. Para a amostra de GA de maior massa molecular a 0.5 %, deixou de ser nítida uma fase proteica contínua, podendo ter ocorrido inversão de fases, ou seja, a fase contínua ser predominantemente formada por polissacarídeo. Estes resultados sugerem, como esperado, que a diminuição da massa molecular diminui os processos segregativos por decréscimo da incompatibilidade termodinâmica entre os biopolímeros. A microestrutura de algumas misturas revelou a existência de separação de fase dupla, tal como já se tinha referido na discussão da microestrutura de misturas com diferentes GM.

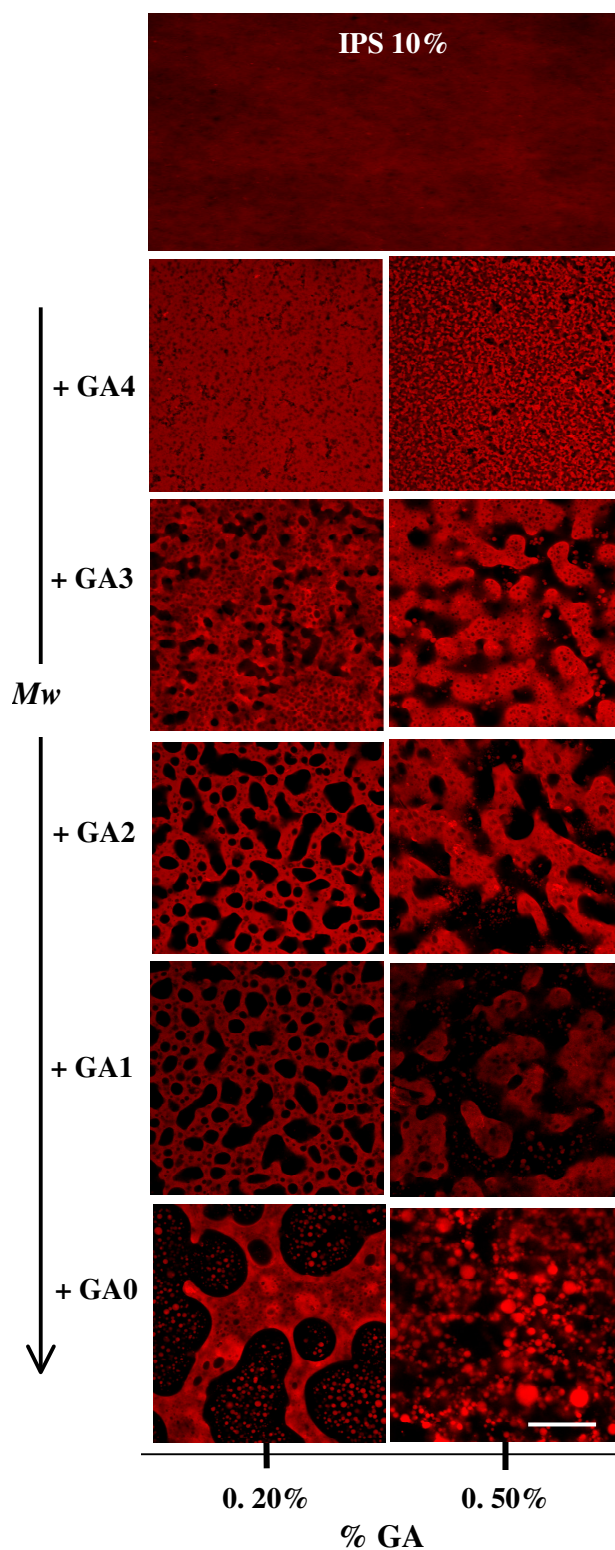


Figura 3.50- Imagens de CLSM de géis de IPS e de IPS + GA com diferentes massas moleculares, para uma concentração de proteína de 10 % e de GA de 0.2% e 0.5%.

Com a Figura 3.51 pretendeu-se relacionar o comportamento viscoelástico dos sistemas em estudo com a microestrutura dos géis obtidos.

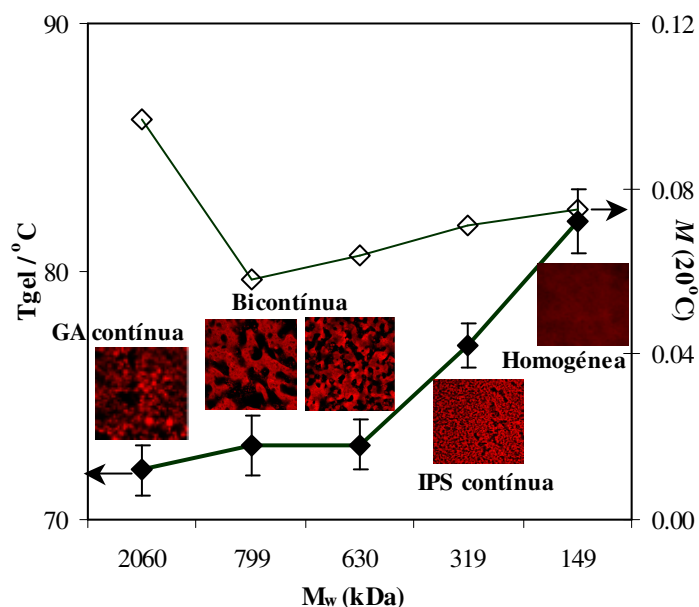


Figura 3.51- Variação da temperatura de gelificação (T_{gel}) e da constante M com a massa molecular das amostras de GA (0.5%) em estudo e microestrutura correspondente dos sistemas contendo 10% de proteína

O aumento da massa molecular da GA promoveu a diminuição da temperatura de gelificação provavelmente porque a incompatibilidade entre os biopolímeros aumentou conduzindo a um aumento da concentração local de cada componente, o que favoreceu as interações entre moléculas proteicas desnaturadas, permitindo assim a temperaturas inferiores formar-se uma estrutura tridimensional. No que se refere ao caráter viscoelástico, verifica-se que este se relaciona com a constituição da fase contínua. Nos sistemas contendo a GA de massa molecular mais elevada, o polissacarídeo constitui a fase contínua, pelo que se obtém géis com caráter viscoso mais forte, como se pode verificar pelo valor da constante M mais elevado. Com o decréscimo da massa molecular, a proteína enriquece progressivamente a fase contínua e o caráter elástico é progressivamente dominante.

Para uma concentração de 6 % de proteína, a título exemplificativo, são apresentadas as imagens de CLSM das misturas contendo as GA de massas moleculares extremas (Figura 3.52).

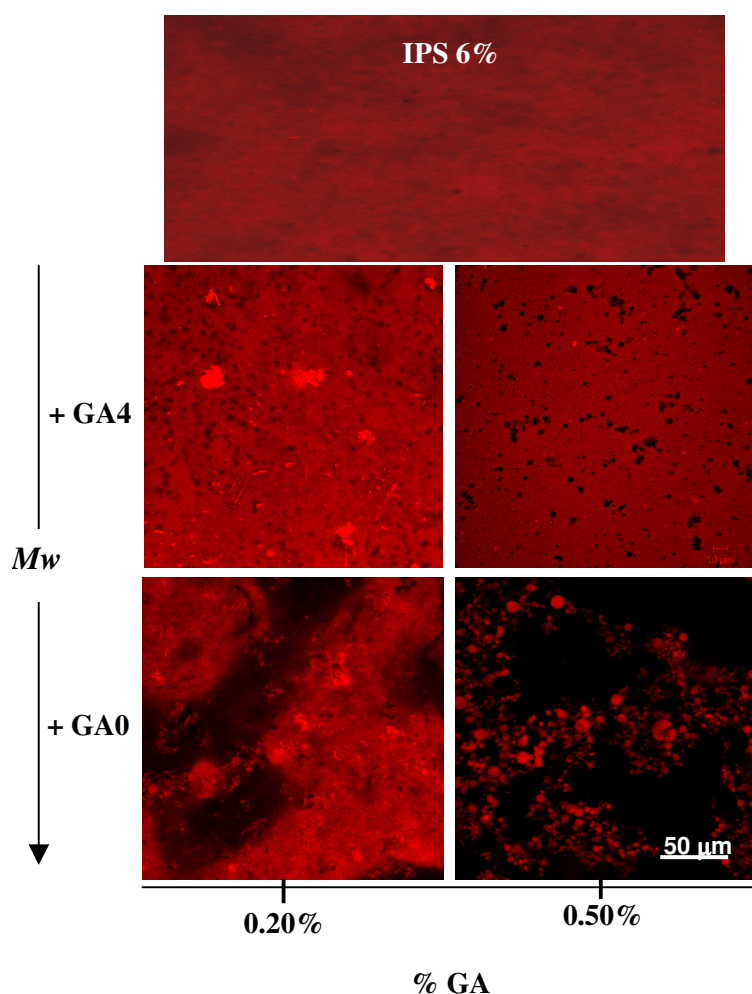


Figura 3.52- Imagens de CLSM de géis de IPS e de IPS + GA com as massas moleculares extremas (GA0 e GA4), para uma concentração de proteína de 6 % e de GA de 0.2% e 0.5%.

Como se pode constatar, a microestrutura do IPS a 6 % é bastante semelhante à do isolado para a concentração de 10 %. A massa molecular, tal como para o sistema mais enriquecido em proteína, apresentou uma forte influência na microestrutura dos sistemas, ocorrendo igualmente a separação de fases. A imagem referente ao sistema com GA de menor massa molecular não demonstra a ocorrência de uma separação de fases tão intensa como o correspondente sistema com uma maior concentração de proteína. Provavelmente, na menor concentração proteica, a fase contínua rica em proteína forma uma matriz com espaços que possivelmente acomodam as pequenas cadeias de polissacarídeo. Com o aumento da quantidade de GA adicionada, já é visível a separação de fases. Por outro lado, com a adição da GA de maior massa molecular observa-se, mesmo para a menor concentração de GA adicionada, uma tendência para a inversão de fases, onde a fase rica

em polissacarídeo tende já a ocupar uma grande extensão da microestrutura e nem toda a proteína integra a fase contínua, constatando-se a existência de elementos proteicos esféricos livres. O aumento da concentração da GA intensificou a separação de fases, surgindo a proteína na forma de porções esféricas mas em menor quantidade do que nos sistemas com a maior concentração proteica.

3.4 Considerações finais

O trabalho apresentado e discutido neste capítulo mostra que a adição de GM, um polissacarídeo neutro não gelificante, a soluções de IPS a pH 7 e baixa força iônica, promoveu alterações no mecanismo de gelificação induzido termicamente, bem como nas propriedades viscoelásticas dos sistemas, refletindo-se consequentemente na microestrutura dos géis finais. A extensão destas alterações dependeu da origem (grau de ramificação), massa molecular da GM e da razão IPS/GM.

Nas condições estudadas neste trabalho, a adição de GM apresentou um efeito positivo nas propriedades gelificantes do IPS, sendo os principais efeitos observados o aumento dos módulos viscoelásticos e a diminuição da temperatura de gelificação, efeitos frequentemente descritos na literatura para misturas de proteínas de soja/polissacarídeos (Ortiz *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2008; Fitzsimons *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2009; Cavallieri *et al.*, 2010). A influência da massa molecular fez-se sentir predominantemente na proporção entre o caráter elástico e viscoso que a GA atribuiu ao sistema final, o que se concluiu estar relacionado com a constituição da fase contínua. Como seria de esperar, observou-se a ocorrência de separação de fases entre as amostras de GM e o IPS, como resultado da incompatibilidade termodinâmica entre os biopolímeros, efeito descrito, frequentemente, na literatura para misturas de IPS com polissacarídeos (Li *et al.*, 2008a; Li *et al.*, 2008b; Li *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2009; Cavallieri *et al.*, 2012). A consequência da segregação dos biopolímeros e do aumento da concentração local de cada componente, para o comportamento reológico dos géis, consistiu essencialmente, na obtenção de géis mais rígidos e na diminuição da concentração crítica de gelificação. Contudo, a extensão destes efeitos foi dependente da massa molecular, do grau de ramificação e da concentração da GM concluindo-se que o aumento da massa molecular e o decréscimo do grau de ramificação da GM intensificaram os efeitos da adição do polissacarídeo.

Regra geral, a matriz proteica formou uma fase contínua que acomodou as cadeias de polissacarídeo. O aumento da massa molecular da GA aumentou a extensão da fase dispersa e, para a amostra com maior massa molecular, observou-se uma inversão de fases, com a fase contínua a ser formada predominantemente por polissacarídeo. Efeito semelhante foi observado com a diminuição do grau de ramificação da GM. Nestes sistemas, a GA conferiu caráter predominantemente viscoso possivelmente como resultado da diferente constituição da fase contínua. Foi assim possível relacionar as propriedades viscoelásticas dos sistemas com as respectivas microestruturas.

Do ponto de vista prático, estes resultados mostram que uma gama variada de propriedades (reológicas e microestruturais) pode ser obtida alterando as características estruturais do polissacarídeo inserido num sistema misto IPS/GA, possibilitando obter diferentes texturas e microestruturas com potencial aplicação em diferentes áreas.

Referências Bibliográficas

- Alves, M.M., Garnier, C., Lefebvre, J. e Gonçalves, M.P. (2001). Microstructure and flow behaviour of liquid water-gelatin-locust bean gum systems. *Food Hydrocolloids*, 15: 117-125.
- Andrade, C.T., Azero, E.G. Luciano, L. e Gonçalves, M.P. (2000). Rheological properties of mixtures of kappa-carrageenan from *Hypnea musciformis* and galactomannan from *Cassia javanica*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 27: 349-353.
- Beer, M.U., Wood, P.J. e Weisz, J. (1999). A simple and rapid method for evaluation of Mark-Houwink-Sakurada constants of linear random coil polysaccharides using molecular weight and intrinsic viscosity determined by high performance size exclusion chromatography: application to guar galactomannan. *Carbohydrate Polymers*, 39: 377-380.
- Belder, A.N. e Granath, K. (1973). Preparation and properties of fluorescein-labelled dextrans. *Carbohydrate Research*, 30: 375-378.
- Blakeney, A.B., Harris, P.J., Henry, R.J. e Stone, B.A. (1983). A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydrate Research*, 113: 291-299.
- Bourbon, A.I., Pinheiro, A.C., Ribeiro, C., Miranda, C., Maia, J.M., Teixeira, J.A. e Vicente, A.A. (2010). Characterization of galactomannans extracted from seeds of *Gleditsia triacanthos* and *Sophora japonica* through shear and extensional rheology: comparasion with guar gum and locust bean gum. *Food Hydrocolloids*, 24: 184-192.
- Bouriot, S., Garnier, C. e Doublier, J.L. (1999). Phase separation, rheology and structure of micellar caseine-galactomannan mixtures. *International Dairy Journal*, 9: 353-357.
- Braga, A.L.M., Azevedo, A., Marques, M.J., Menossi, M. e Cunha, R.L. (2006). Interactions between soy protein isolate and xanthan in heat-induced gels: the effect of salt addition. *Food Hydrocolloids*, 20: 1178-1189.
- Butler, M.F. (2002). Mechanism and kinetics of phase separation in a gelatine/maltodextrin mixture studied by small-angle light scattering. *Biomacromolecules*, 3: 676-683.
- Cavallieri, A.L.F., Garcez, M.M., Takeuchi, K.P. e Lopes da Cunha, R. (2010). Heat-induced gels of soy protein and k-carrageenan at different pH values. *International Journal of Food Science & Technology*, 45: 1130-1137.
- Cheng, Y. e Prud'homme, R.K. (2000). Enzymatic degradation of guar and substituted guar galactomannans. *Biomacromolecules*, 1: 782-788.
- Cheng, Y., Brown, K.M. e Prud'homme, R.K. (2002). Preparation and characterization of molecular weight fractions of guar galactomannans using acid and enzymatic hydrolysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 31: 29-35.
- Chenlo, F., Moreira, R. e Silva, C. (2010). Rheological properties of aqueous dispersions of tragacanth and guar gum at different concentrations. *Journal of Texture Studies*, 41: 396-415.
- Chenlo, F., Moreira, R., Pereira, G. e Silva, C. (2009). Rheological modelling of binary and ternary systems of tragacanth, guar gum and methylcellulose in dilute range of concentration at

different temperatures. *LWT- Food Science and Technology*, 42: 519-524.

Clark, A.H., Richardson, R.K., Ross-Murphy, S.B. e Stubbs, J.M. (1983). Structural and mechanical properties of agar/ elatine cogels. Small-deformation studies. *Macromolecules*, 16: 1367-1374.

Clark, A.H. e Ross-Murphy, S.B. (1987). Structural and mechanical properties of biopolymer gels. *Advances in Polymer Science*, 83: 57-192.

Daas, P. J. H., Schols, H. A. e de Jongh, H. H. J. (2000). On the galactosyl distribution of commercial galactomannans. *Carbohydrate Research*, 329: 609-619.

De Bont, P.W., van Kempen, G.M.P. e Vreeker, R. (2002). Phase separation in milk protein and amylopectin mixtures. *Food Hydrocolloids*, 16: 127-138.

Dea, I.C.M. e Morrison, A. (1975). Chemistry and interactions of seed galactomannans. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 31: 241-312.

Deuel, H. e Neukom, H. (1954). Some properties of locust bean gum. *Advances in Chemistry Series (ACS)*, 11:51-61.

Doublier, J.L. e Launay, B. (1981). Rheology of galactomannan solutions: comparative study of guar gum and locust bean gum. *Journal of Texture Studies*, 12: 151-172.

Fernandes, P.B. (1995). Influence of galactomannan on the structure and thermal behaviour of xanthan/galactomannan mixtures. *Journal of Food Engineering*, 24: 269-283.

Fitzsimons, S.M., Mulvihill, D.M. e Morris, E.R. (2008). Large enhancements in thermogelation of whey protein isolate by incorporation of very low concentrations of guar gum. *Food Hydrocolloids*, 22: 576-586.

Food and Nutrition Board – National Research Council (1981) *Food Chemicals Codex*, National Academy Press, Washington, DC.

Funami, T., Kataoka, Y., Noda, S., Hiroe, M., Ishihara, S., Asai, I., Takahashi, R. e Nishinari, K. (2008). Functions of fenugreek gum with different molecular weights on the gelatinization and retrogradation behaviors of corn starch – 1: Characterizations of fenugreek gum and investigations of corn starch/ fenugreek gum composite system at a relatively high starch concentration: 15 w/v%. *Food Hydrocolloids*, 22: 763-776.

Funami, T., Kataoka, Y., Omoto, T., Goto, Y., Asai, I. e Nishinari, K. (2005). Food hydrocolloids control the gelatinization and retrogradation behaviour of starch. 2a. Functions of guar gums with different molecular weights on the gelatinization behaviour of corn starch. *Food Hydrocolloids*, 19: 15-24.

Gonçalves, M.P., Torres, D., Andrade, C.T., Azer, E.G. e Lefebvre, J. (2004). Rheological study of the effect of *Cassia javanica* galactomannans on the heat-set gelation of a whey protein isolate at pH 7. *Food Hydrocolloids*, 18: 181-189.

Higiro, J., Herald, T.J., Alavi, S. e Bean, A.S. (2007). Rheological study of xanthan and locust bean gum interaction in dilute solution: Effect of salt. *Food Research International*, 40: 435-447.

- Hua, Y., Cui, S.W. e Wang, Q., Mine, Y. e Poysa, V. (2005). Heat induced gelling properties of soy protein isolates prepared from different defatted soybean flours. *Food Research International*, 38: 377-385.
- Hua, Y., Cui, S.W. e Wang, Q. (2003). Gelling property of soy protein-gum mixtures. *Food Hydrocolloids*, 17: 889-894.
- Ikeda, S. (2003). Heat-induced gelation of whey proteins observed by rheology, atomic force microscopy, and Raman scattering spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, 17: 399-406.
- Ikeda, S. e Foegeding, E.A. (1999). Dynamic viscoelastic properties of thermally induced whey protein isolate gels with added lecithin. *Food Hydrocolloids*, 13: 245-254.
- Jaramillo, D.P., Roberts, R.F. e Coupland, J.N. (2011). Effect of pH on the properties of soy-protein-pectin complexes. *Food Research International*, 44: 911-916.
- Kavanagh, G.M., Clark, A.H. e Ross-Murphy, S.B. (2000). Heat-induced gelation of globular proteins: 4. Gelation kinetics of low pH β -lactoglobulin gels. *Langmuir*, 16: 9584-9594.
- Kok, M.S. (2010). Rheological study of galactomannan depolymerisation at elevated temperatures: Effect of varying pH and addition of antioxidants. *Carbohydrate Polymers*, 81: 567-571.
- Lapasin, R. e Prici, S. (1999). Rheology of industrial polysaccharides: Theory and applications. (pp 312-325), Gaithersburg, MD: Aspen Publishers.
- Lazaridou, A, Biliaderis, C.G. e Izydorczyk, M.S. (2000). Structural characteristics and rheological properties of locust bean galactomannans: a comparison of samples from different carob tree populations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81: 68-75.
- Lazaridou, A, Biliaderis, C.G. e Izydorczyk, M.S. (2001). Structural characteristics and rheological properties of locust bean galactomannans: a comparison of samples from different carob tree populations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81: 68-75.
- Lazaridou, A, Biliaderis, C.G. e Kontogiorgos, V. (2003). Molecular weight effects on solution rheology of pullulan and mechanical properties of its films. *Carbohydrate Polymers*, 52 : 151-166.
- Li, X., Cheng, Y., Yi, C., Yang, C. e Cui, S. (2009). Effect of ionic strength on the heat-induced soy protein aggregation and the phase separation of soy protein aggregate/dextran mixtures. *Food Hydrocolloids*, 23: 1015-1023.
- Li, X., Deng, F., Hua, Y., Qiu, A., Yang, C. e Cui, S. (2008a). Effect of molecular weight of dextran on the phase behavior and microstructure of preheated soy protein/dextran mixtures. *Carbohydrate Polymers*, 72: 160-168.
- Li, X., Hua, Y., Qiu, A., Yang, C. e Cui, S. (2008b). Phase behavior and microstructure of preheated soy proteins and k-carrageenan mixtures. *Food Hydrocolloids*, 22: 845-853.
- Lopes da Silva, J.A e Gonçalves, M.P. (1990). Studies on a purification method for locust bean gum by precipitation with isopropanol. *Food Hydrocolloids*, 4: 277-287.
- Lopes da Silva, J.A, Cardoso, S.M., Tavares, C. e Monteiro, S.R. (2004). Reologia de

Biopolímeros: Dispersões e géis. Em Melo, J.S., Moreno, M.J., Burrows, H.D. e Gil, M.H. (Eds.), *Química de Polímeros* (pp.571-590). Imprensa de Coimbra: Coimbra, Portugal.

Lopes da Silva, J.A., Gonçalves, M.P., Doublier, J.L. e Axelos, M.AV. (1996). Effect of galactomannans on the viscoelastic behaviour of pectin/calcium networks. *Polymer Gels and Networks*, 4: 65-83.

McCleary, B.V., Amado, R., Waibel, R. e Neukon, H. (1981). Effect of galactose content on the solution and interaction properties of guar and carob galactomannans. *Carbohydrate Research*, 92: 269-285.

McCleary, B.V., Clark, A.H., Dea, I.C.M. e Rees, D.A (1985). The fine structures of carob and guar galactomannans. *Carbohydrate Research*, 139: 237-260.

Mellema, M., Walstra, P., van Opheusden, J.H.J. e van Vliet, T. (2002). Effects of structural rearrangements on the rheology of rennet-induced casein particle gels. *Advances in Colloid and Interface Science*, 98: 25-50.

Monteiro, S.R. (2006). Efeito da massa molecular de um polissacarídeo na gelificação de proteínas. Tese de Mestrado. Universidade de Aveiro.

Monteiro, S.R., Tavares, C., Evtuguin, D.V., Moreno, N. e Lopes da Silva, J.A (2005). Influence of galactomannans with different molecular weights on the gelation of whey proteins at neutral pH. *Biomacromolecules*, 6: 3291-3299.

Morris, E.R., Cutler, A.N., Ross-Murphy, S.B. e Rees, D.A. (1981). Concentration and shear rate dependence of viscosity in random coil polysaccharide solutions. *Carbohydrate Polymers*, 1: 5-21.

Nagano, T., Hirotsuka, M., Mori, H., Kohyama, K. e Nishinari, K. (1992). Dynamic viscoelastic study on the gelation of 7S globulin from soybeans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 941-944.

Neukom, H. (1989). Galactomannans: properties and applications. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 22: 41-45.

Norton, I.T. e Frith, W.J. (2001). Microstructure design in mixed biopolymer composites. *Food Hydrocolloids*, 15: 543-553.

O'Kane, F.E., Happe, R.P., Vereijken, J.M., Gruppen, H. e Van Boekel, M.A.J.S. (2004). Heat-induced gelation of pea legumin: comparison with soybean glycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 5071-5078.

Ortiz, S.E.Molina, Puppo, M.C. e Wagner, J.R. (2004). Relationship between structural changes and functional properties of soy protein isolates-carrageenan systems. *Food Hydrocolloids*, 18: 1045-1053.

Pai, V.B. e Khan, S.A (2002). Gelation and rheology of xanthan/enzyme-modified guar blends. *Carbohydrate Polymers*, 49: 207-216.

Panegassi, V.R., Serra, G.E. e Buckeridge, M.S. (2000). Potencial tecnológico do galactomanano de sementes de Faveiro (*Dimorphandra mollis*) para uso na indústria de alimentos. *Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 20: 406-415.

- Picout, D.R., Ross-Murphy, S.B., Errington, N. e Harding, S.E. (2001). Pressure Cell Assisted Solution Characterization of Polysaccharides. 1. Guar Gum. *Biomacromolecules*, 2, 1301-1309.
- Picout, D.R., Ross-Murphy, S.B., Jumel, K. e Harding, S.E. (2002). Pressure Cell Assisted Solution Characterization of Polysaccharides. 2. Locust Bean Gum and Tara Gum. *Biomacromolecules*, 3, 761-767.
- Pollard, M.A., Kelly, R., Fischer, P., Windhab, E.J., Eder, B. e Amadò, R. (2008). Investigation of molecular weight distribution of LBG galactomannan for flours prepared from individual seeds, mixtures, and commercial samples. *Food Hydrocolloids*, 22: 1596-1606.
- Puppo, M.C., Lupano, C.E. e Añón, M.C. (1995). Gelation of soybean protein isolates in acidic conditions. Effect of pH and protein concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 2356-2361.
- Rayment, P., Ross-Murphy, S. e Ellis, P.R. (1997). Rheological properties of guar galactomannan and rice starch mixtures. II. Creep measurements. *Carbohydrate Polymers*, 35: 55-63.
- Rayment, P., Ross-Murphy, S.B. e Ellis, P.R. (1995). Rheological properties of guar galactomannan and rice starch mixtures-I. Steady shear measurements. *Carbohydrate Polymers*, 28: 121-130.
- Renard, D. e Lefebvre, J. (1992). Gelation of globular proteins: effect of pH and ionic strength on the critical concentration for gel formation. A simple model and its application to β -lactoglobulin heat-induced gelation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 14: 287-291.
- Renkema, J.M.S e van Vliet, T. (2002). Heat-induced Gel Formation by Soy Proteins at neutral pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 1569-1573.
- Renkema, J.M.S., Gruppen, H. e van Vliet, T. (2002). The influence of pH and ionic strength on heat-induced formation and rheological properties of soy protein gels in relation to denaturation and their composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 6064-6071.
- Richardson, P.H., Willmer, J. e Foster, T.J. (1998). Dilute solution properties of guar and locust bean gum in sucrose solutions. *Food Hydrocolloids*, 12: 339-348.
- Ross-Murphy, S.B. (1984). Rheological methods. Em *Biophysical Methods in Food Research*, 195-290.
- Sánchez, V.E., Bartholomai, G.B. e Pilosof, A.M.R. (1995). Rheological properties of gums as related to their water binding capacity and to soy protein interaction. *LWT-Food Science and Technology*, 28: 380-385.
- Sandolo, C., Bulone, D., Mangione, M.R., Margheritelli, S., Meo, C.D., Alhaique, F., Matricardi, P. e Coviello, T. (2010). Synergistic interaction of locust bean gum and xanthan investigated by rheology and light scattering. *Carbohydrate Polymers*, 82: 733-741.
- Schorsch, C., Garnier, C. e Doublier, J-L. (1997). Viscoelastic properties of xanthan/galactomannan mixtures: comparison of guar gum with locust bean gum. *Carbohydrate Polymers*, 34: 165-175.

Schorsch, C., Jones, M.G. e Norton, I.T. (1999). Thermodynamic incompatibility and microstructure of milk protein/locust bean gum/sucrose systems. *Food Hydrocolloids*, 13: 89-99.

Sittikijyothin, W., Torres, D. e Gonçalves, M.P. (2005). Modelling the rheological behaviour of galactomannan aqueous solutions. *Carbohydrate Polymers*, 59: 339-350.

Sorgentini, D.A., Wagner, J.R. e Añón, M.C. (1995). Effects of thermal treatment of soy protein isolate on the characteristics and structure-function relationship of soluble and insoluble fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 2471-2479.

Tavares, C. e Lopes da Silva, J.A (2003). Rheology of galactomannan-whey protein mixed systems. *International Dairy Journal*, 13: 699-706.

Tavares, C., Monteiro, S. R.; Moreno, N. e Lopes da Silva, J.A (2005). Does the branching degree of galactomannans influence their effect on whey protein gelation? *Colloids and surfaces A: Physicochemistry Engineering Aspects*, 270. 213-219.

Tayal, A., Kelly, R.M. e Khan, S.A. (1999). Rheology and molecular weight changes during enzymatic degradation of a water-soluble polymer. *Macromolecules*, 32: 294-300.

Tobitani, A. e Ross-Murphy, S.B. (1997). Heat-induced gelation of globular proteins. 1. Model for the effects of time and temperature on the gelation time of BSA gels. *Macromolecules*, 30: 4845-4854.

Tolstoguzov, V.B. (2003). Some thermodynamic considerations in food formulation. *Food Hydrocolloids*, 17: 1-23.

Tromp, R.H., Rennie, A.R. e Jones, R.A.L. (1995). Kinetics of the simultaneous phase separation and gelation in solutions of dextran and gelatine. *Macromolecules*, 28: 4129-4138.

Tromp, R.H., Velde, F., Riel, J. e Paques, M. (2001). Confocal scanning light microscopy (CLSM) on mixtures of gelatine and polysaccharides. *Food Research International*, 34: 931-938.

Turgeon, S.L., Beaulieu, M., Schmitt, C. e Sanchez, C. (2003). Protein-polysaccharide interactions: phase-ordering kinetics, thermodynamic and structural aspects. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 8: 401-414.

Verheul, M., Roefs, S.P.F.M., Mellema, J. e de Kruif, K.G. (1998). Power law behavior of structural properties of protein gels. *Langmuir*, 14: 2263-2268.

Wang, Q., Wood, P.J., Cui, W. e Ross-Murphy, S.B. (2001). The effect of autoclaving on the dispersibility and stability of three neutral polysaccharides in dilute aqueous solutions. *Carbohydrate Polymers*, 45:355-362.

Wientjes, R.H.W., Duits, M.H.G., Bakker, J.W.P., Jongschaap, R.J.J. e Mellema, J. (2001). Linear viscoelastic behaviour of enzymatically modified guar gum solutions: structure, relaxations and gel formation. *Macromolecules*, 34: 6014-6023.

Zhu, J-H., Yang, X-Q., Ahmad, I., Li, L., Wang, X-Y. e Liu C. (2008). Rheological properties of k-carrageenan and soybean glycinin mixed gels. *Food Research International*, 41: 219-228.

Zhu, J-H., Yang, X-Q., Ahmad, I., Wang, X-Y. e Wu, L-Y. (2009). Effect of guar gum on the rheological, thermal and textural properties of soybean β -conglycinin gel. *International Journal of Food Science and Technology*, 44: 1314-1322.

CAPÍTULO 4

Avaliação das propriedades funcionais de
hidrolisados enzimáticos de proteínas de soja e
suas misturas com goma de alfarroba

A parte do trabalho descrita neste capítulo teve como objetivo avaliar determinadas propriedades funcionais, mais concretamente, a capacidade gelificante e emulsionante, de hidrolisados enzimáticos de proteínas de soja e das suas misturas com goma de alfarroba (GA) de forma a potencializar e diversificar as aplicações industriais das proteínas de soja. A hidrólise enzimática parcial de proteínas de soja é um processo conhecido e já demonstrado eficaz na melhoria de determinadas propriedades funcionais destas proteínas (Panyam e Kilara, 1996). No estudo agora realizado pretendeu-se não só aprofundar o conhecimento acerca de como determinado processo de hidrólise das proteínas de soja influencia as suas propriedades funcionais, nomeadamente a gelificação, propriedade menos estudada, mas também conjugar esta estratégia com a adição de um polissacarídeo, com vista a potencializar a melhoria dessas propriedades funcionais. Neste caso selecionou-se a goma de alfarroba, polissacarídeo já estudado nos capítulos anteriores e para o qual se verificaram os efeitos mais importantes sobre a gelificação das proteínas de soja.

4.1 Introdução

4.1.1 Hidrólise enzimática de proteínas

A modificação de proteínas através da hidrólise é uma tecnologia bastante desenvolvida como forma de agregar valor, funcionalidade e ampliar o leque de aplicações para materiais de utilização pouco convencionais como subprodutos e resíduos da indústria alimentícia (Donald *et al.*, 1994).

A proteólise pode ser realizada com o propósito de alterar ou induzir propriedades funcionais, bem como produzir pequenos peptídeos e aminoácidos livres destinados a compor formulações dietéticas, enriquecer nutricionalmente alimentos e atuar como agentes aromatizantes (Adler-Nissen, 1986).

Os primeiros hidrolisados proteicos que se conhecem, comercialmente disponíveis, apareceram durante a II Guerra Mundial (Adler-Nissen, 1986). As proteínas, quando submetidas à hidrólise, originam peptídeos de tamanhos variáveis e dotados de diferentes atividades.

Os hidrolisados de proteína de soja têm sido reportados como fonte apropriada de proteína para nutrição humana uma vez que são fisiologicamente melhores do que a proteína intacta

ou uma mistura equivalente de aminoácidos (Boza *et al.*, 2000) pois a sua absorção intestinal é mais efetiva devido ao aumento de solubilidade e conteúdo peptídico (Ziegler *et al.*, 1998).

São várias as possíveis aplicações dos hidrolisados salientando-se a aplicação clínica, como produtos geriátricos, suplementos energéticos, dietas de controlo de peso e dietas especiais destinadas, por exemplo, a indivíduos portadores de fenilcetonúria (Frokjaer, 1994). A ação terapêutica dos hidrolisados proteicos tem sido também reportada nomeadamente no tratamento de diarreia, má absorção de minerais (caseinofosfopeptídeos) ou em casos de imunodeficiência (Meisel e Schlimme, 1990).

Contudo, a hidrólise de proteínas leva à libertação de aminoácidos ou peptídeos de sabor amargo (Adler-Nissen, 1984), sendo esta uma das principais limitações à incorporação de hidrolisados proteicos em alimentos. O amargor dos péptidos está relacionado com a existência de compostos voláteis (Aaslyng *et al.*, 1998) e a formação de pequenos péptidos compostos principalmente por aminoácidos hidrofóbicos (Ney, 1979; Clemente, 2000).

Comparada com a hidrólise ácida ou alcalina, a hidrólise enzimática de proteínas, utilizando proteases seletivas, específicas ou não na clivagem de ligações peptídicas ao longo da cadeia polipeptídica, proporciona melhores condições de processo e pouca ou nenhuma formação de produtos indesejáveis. Em adição, o hidrolisado final, após neutralização, contém pouca quantidade de sal. A clivagem de ligações peptídicas resulta na redução da massa molecular, aumento de grupos ionizáveis, com concomitante aumento da hidrofilicidade devido ao aumento de grupos terminais amino e carboxilícos, para além da exposição de regiões hidrofóbicas até então escondidas. As alterações nas propriedades funcionais de uma proteína, promovidas por modificação enzimática, são o resultado direto dos efeitos anteriormente referidos (Panyam e Kilara, 1996).

4.1.1.1 Processos para obtenção de hidrolisados enzimáticos de proteína

Basicamente são três os processos utilizados na produção de hidrolisados proteicos por ação enzimática: 1) sistemas descontínuos; 2) sistemas com proteases imobilizadas e 3) reatores de membrana.

Em sistemas descontínuos uma mistura enzima e substrato é colocada num reator, a temperatura e pH constantes, durante o tempo necessário para atingir o grau de hidrólise (GH) desejado. A seguir, a enzima é inativada por tratamento térmico e/ou alteração do pH da solução. No segundo processo, num reator contendo o substrato, adiciona-se a enzima imobilizada numa matriz sólida, insolúvel em água. Esta condição permite recuperar a enzima numa forma ativa (Khare *et al.*, 1994). Reatores providos de uma membrana semipermeável, com tamanho de poro e propriedades físico-químicas apropriadas, configuram o terceiro método para obtenção de hidrolisados enzimáticos. Neste processo, o substrato é bombeado de maneira uniforme para dentro do reator, onde se encontra a solução de enzima. O produto da hidrólise, capaz de atravessar a membrana, vai sendo permanentemente retirado.

A principal vantagem dos dois últimos métodos refere-se à possibilidade de reutilização da enzima, garantindo assim menores custos embora a enzima imobilizada apresente uma perda gradual da sua atividade. O sistema descontínuo, embora com custos elevados devido à necessidade de grande quantidade de enzima, é o método mais utilizado na obtenção de hidrolisados enzimáticos de proteína, por facilitar a manutenção das condições sanitárias, permitir o controlo da reação e estudos de cinética enzimática (Adler-Nissen, 1986).

4.1.1.2 Fatores que influenciam a hidrólise enzimática de proteínas

O resultado da hidrólise enzimática das proteínas não é linear, mas sim dependente de vários fatores, nomeadamente, especificidade da enzima, extensão da desnaturação da proteína (substrato), conformação da proteína, solubilidade da proteína desnaturada, relação enzima/substrato (E/S), força iónica, temperatura, pH entre outros.

A especificidade de uma enzima é um fator importante para a reação de hidrólise, influenciando igualmente no número e na localização das ligações peptídicas clivadas. O tipo de protease comercial utilizado na reação enzimática influencia determinantemente as propriedades funcionais dos hidrolisados proteicos obtidos (Ortiz e Añón, 2000; Ortiz e Añón 2001; Kumar *et al.*, 2004; Peñas *et al.*, 2004; Peñas *et al.*, 2006; Zhao e Hou, 2009). Algumas enzimas apresentam especificidade para ligações peptídicas nas quais participam determinados aminoácidos enquanto outras têm um espectro de ação mais amplo, sendo

menos seletivas. Por exemplo, a neutrase catalisa preferencialmente ligações entre aminoácidos hidrofóbicos e, por isso, tem vários locais possíveis para hidrolisar as proteínas de soja ao passo que a tripsina apenas catalisa as ligações estabelecidas entre os grupos carboxilo da lisina e arginina, tendo assim maior especificidade do que a neutrase (Zhao e Hou, 2009). Isto reflete-se, como seria de esperar, na massa molecular e consequentemente nas propriedades funcionais, nomeadamente na capacidade emulsionante e gelificante dos péptidos obtidos influenciando determinantemente as suas possíveis aplicações.

No trabalho de Ortiz e Añón (2000), isolados de proteínas de soja extraídos laboratorialmente, foram hidrolisados com diferentes proteases (papaína, bromelina, hieronimina, pomiferina e cucurbita). Os resultados mostraram que para a mesma relação E/S, a reação enzimática com as diferentes proteases originou perfis electroforéticos distintos resultantes da formação de péptidos com estruturas diferentes, graus de hidrólise variáveis (entre 22 e 47 %) para igual tempo máximo de incubação e capacidade de formação e estabilização de espumas variável. Como resultado, os autores observaram que a especificidade da enzima e o grau de hidrólise influenciaram nas propriedades estruturais e funcionais dos hidrolisados. Mais recentemente, Zhao e Hou (2009) analisaram o efeito das enzimas neutrase e tripsina na hidrólise de proteínas de soja e os resultados obtidos corroboraram as conclusões de Ortiz e Añón (2000) mostrando que a composição peptídica dos hidrolisados obtidos é dependente da enzima utilizada (como a neutrase tem menor especificidade do que a tripsina, um maior número de ligações peptídicas foi clivada, obtendo-se peptidos com menor massa molecular) e determina as propriedades funcionais e consequentemente as aplicações dos péptidos obtidos.

A conformação da proteína é outro fator que determina a extensão da hidrólise. Muitas proteínas são conhecidas pela facilidade com que são hidrolisadas quando estão desnaturadas. No estado nativo muitas das ligações peptídicas existentes na proteína encontram-se no interior da estrutura terciária pelo que não estão disponíveis para interagir com o solvente e com a enzima. Isto pode ser comprovado no trabalho de Adler-Nissen (1986) onde as proteínas de soja nativa e desnaturada foram hidrolisadas com a enzima alcalase. Os resultados cromatográficos sugeriram que o tratamento térmico promoveu o desdobramento das moléculas de proteína, facilitando o acesso da enzima às ligações

peptídicas, o que resultou na formação de hidrolisados com grande quantidade de peptídeos de cadeias médias no caso da proteína desnaturada, enquanto que para a proteína nativa obtiveram-se peptídeos com elevada massa molecular. No trabalho de Ortiz e Wagner (2002) foi utilizada a enzima bromelina e os resultados corroboraram as conclusões descritas por Adler-Nissen (1986), constatando-se assim o papel da conformação da proteína na eficiência da hidrólise enzimática independentemente da especificidade da enzima utilizada.

As proteínas de soja são, geralmente, resistentes à hidrólise enzimática em virtude da sua estrutura terciária e quaternária compacta, o que protege muitas das ligações peptídicas (Tsumura *et al.*, 2004; Govindaraju e Srinivas, 2007). Neste sentido, a aplicação de pré-tratamentos é uma etapa importante para alterar as características estruturais das proteínas de soja, aumentando a acessibilidade das enzimas e aumentando a funcionalidade destas proteínas. Para além do tratamento térmico já descrito, são várias as tecnologias que promovem alterações conformacionais e que podem ser aplicadas como pré-tratamento. A tecnologia de alta pressão tem despertado o interesse da comunidade científica e são vários os trabalhos que demonstraram o efeito desta tecnologia na estrutura das proteínas (Puppo *et al.*, 2004; Alvarez *et al.*, 2008; Tang e Ma, 2009). Dependendo da gama de pressões aplicadas, um dos efeitos da alta pressão é o desdobramento e desnaturação das proteínas. Investigando os efeitos da alta pressão na hidrólise enzimática de proteínas do soro da soja com três enzimas diferentes, pepsina, tripsina e α -quimotripsina, Peñas *et al.* (2004), corroborando trabalhos anteriores em proteínas lácticas e de soja (Hayashi *et al.*, 1987; Stapelfeldt *et al.*, 1996; Peñas e Préstamo, 2002), observaram que a extensão da hidrólise enzimática aumentou com o processamento a 100 e 200 MPa por 15 min embora pressurizações superiores (300 e 400 MPa) tivessem resultado no decréscimo acentuado do grau de hidrólise (Peñas e Préstamo, 2002). A explicação para estes resultados baseou-se no grau de agregação resultante das condições de pressão aplicadas.

Num outro trabalho, Peñas *et al.* (2006) avaliaram a atividade hidrolítica das enzimas alcalase, corolase PNL, neutrase e colorase 7089, sob diferentes condições de tratamento por alta pressão. Os resultados demonstraram, mais uma vez, que o tratamento por alta pressão favoreceu a proteólise por qualquer uma das quatro enzimas em estudo embora a extensão da hidrólise tenha sido dependente do tipo de protease usada bem como das

condições de pressurização revelando que os efeitos promovidos pela alta pressão afetou diferencialmente a atividade das enzimas em estudo.

A técnica de ultrasons ($10\text{-}100\text{ W/cm}^2$) é uma tecnologia relativamente fácil e rápida que também tem sido aplicada com o objetivo de modificar as propriedades estruturais e funcionais das proteínas de soja (Karki *et al.*, 2009; Jambrak *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2011) uma vez que rompe as ligações eletrostáticas e as interações hidrofóbicas entre as moléculas proteicas, rompendo a estrutura terciária e/ou quaternária das proteínas globulares, aumentando assim o número de locais de hidrólise expostos (Jambrak *et al.*, 2009; Jia *et al.*, 2010).

Conhecidos o substrato e a enzima, outras variáveis como pH e temperatura são também determinantes na eficiência da hidrólise. Lee *et al.* (2001) estudaram o efeito do pré-tratamento ácido moderado ($0.01\text{-}1.0\text{ mol/L HCl}$) de farinhas de soja e concluíram que o tratamento favoreceu a hidrólise enzimática pelas enzimas alcalase e peptidase NP-2 resultando num aumento do grau de hidrólise e do conteúdo em grupos α -amino. Por outro lado, os resultados mostraram que a proteólise ocorreu predominantemente durante as primeiras 5 h de reação e que a taxa de hidrólise foi acelerada pelo aumento da concentração de HCl.

No trabalho de Ortiz e Wagner (2002) ficou demonstrado que a enzima bromelina foi mais efetiva na hidrólise dos isolados de soja tratados termicamente a $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ (durante 30 min) do que nos isolados nativos em virtude da total desnaturação das globulinas 7S e 11S nos isolados tratados. Além disso, o pH ao qual o isolado foi aquecido mostrou ser um fator importante para a atividade da bromelina: isolados aquecidos a pH 7 foram mais facilmente hidrolisados pela enzima do que a pH 1.6 obtendo-se, por hidrólise dos primeiros, um aumento de proteínas solúveis a pH 4.5 e a formação de péptidos com massa molecular inferior a 3000 Da entre 2 e 12 h de reação. O tratamento térmico aumentou a digestibilidade enzimática com diminuição considerável das frações de maior massa molecular aumentando assim a solubilidade e a capacidade emulsionante e de formação de espumas (Radha *et al.*, 2008).

4.1.1.3 Enzimas utilizadas na hidrólise enzimática de proteínas de soja

Várias classes de enzimas são capazes de alterar as estruturas das proteínas. As proteases catalisam a hidrólise de uma ligação peptídica de uma proteína e os produtos resultantes são formados por peptídeos de menor massa molecular. As proteases podem ser de origem animal (por exemplo, pepsina, tripsina, quimiotripsina, pancreatina), vegetal (papaina, bromelina) ou microbiana (pronase, alcalase) sendo que algumas delas apresentam especificidade para ligações peptídicas nas quais participam determinados aminoácidos, enquanto outras têm um espectro de ação mais amplo, sendo menos seletivas. A especificidade de uma enzima é um fator determinante do número e localização das ligações peptídicas hidrolisadas (Panyam e Kilara, 1996).

Segundo a literatura, a hidrólise enzimática de proteínas de soja pode ser efetuada por diferentes proteases ou por sistemas enzimáticos formados por várias enzimas (Lee *et al.*, 2001). Trabalhos utilizando a neutrase (Zhao e Hou, 2009), a tripsina (Radha *et al.*, 2008; Zhao e Hou, 2009; Zhang *et al.*, 2012), a pancreatina (Qi *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2011), a bromelina (Ortiz e Añón, 2000; Ortiz e Añón, 2001; Ortiz e Wagner, 2002; Lamsal *et al.*, 2006), a papaina (Ortiz e Añón, 2000), a cucurbita (Ortiz e Añón, 2000; Ortiz e Añón, 2001), a pomiferina (Ortiz e Añón, 2000; Ortiz e Añón, 2001), a hieronimina (Ortiz e Añón, 2000) e a subtilisina carlsberg (Hrcková *et al.*, 2002; Inouye *et al.*, 2009) são descritos na literatura.

Ortiz e Añón (2000) avaliaram a atividade das últimas cinco proteases referidas, estudando os mecanismos e cinéticas de reação e propriedades espumantes dos hidrolisados obtidos. Para as proteases em estudo, verificou-se que a taxa de hidrólise foi maior para o início da reação, atingindo um *plateau* entre 10 a 30 min. No entanto, a bromelina foi a protease que atingiu maiores taxas de hidrólise, principalmente para os primeiros 5 minutos de reação. Com base no modelo de Linderstrom-Lang, foi proposto o mecanismo de reação para cada uma das proteases consideradas. Segundo este modelo, existe um equilíbrio entre a forma nativa e desnaturada das proteínas, sendo a última forma o substrato para as reações proteolíticas. São descritos dois mecanismos de hidrólise: *zipper* e “*one-by-one*” (Adler-Nissen, 1976). O primeiro mecanismo baseia-se na ocorrência de um passo rápido, no qual a estrutura da proteína é destabilizada, expondo as ligações peptídicas, resultando em

vários produtos intermediários. O segundo mecanismo propõe um passo inicial lento, no qual as moléculas são hidrolisadas uma a uma até obter o produto final e, por isso, não se detetam produtos intermediários. Contudo, a maioria das hidrólises enzimáticas ocorre pela combinação dos dois mecanismos descritos embora possa existir uma ligeira prevalência do tipo de mecanismo em função da enzima utilizada.

No trabalho de Ortiz e Añón (2000), os resultados obtidos por eletroforese e os perfis de cromatografia de filtração em gel mostraram que para curtos períodos de tempo, os hidrolisados obtidos através de mecanismos predominantemente do tipo “*one-by-one*” (por exemplo, com as enzimas cucurbita, papaina, hieronimina) apresentaram uma grande similaridade com a estrutura do substrato inicial e para longos períodos de reação, os perfis de RP-HPLC mostraram a formação de uma quantidade bastante significativa de produtos hidrofílicos de massa molecular muito pequena, característica da prevalência do mecanismo “*one-by-one*”. Para as enzimas com prevalência do mecanismo tipo *zipper*, do qual faz parte a bromelina, observou-se, para curtos períodos de reação, um decréscimo das massas moleculares das diferentes espécies formadas e o aparecimento de produtos de hidrólise hidrofóbicos de baixa massa molecular. Entretanto, um decréscimo de produtos com tamanho intermediário e a produção de uma quantidade significativa de peptídeos hidrofílicos foi observado para tempos de reação superiores a 30 min. As propriedades estruturais dos hidrolisados obtidos refletiram-se nas respectivas propriedades funcionais, o que será discutido na secção 4.1.2.

A especificidade da enzima é ainda determinante para a aceitação do produto final por parte do consumidor uma vez que o grau de amargor dos hidrolisados obtidos depende do tipo de enzima utilizada (Kim *et al.*, 1992) pois relaciona-se com a massa molecular dos péptidos formados (Cho *et al.*, 2004; Zhao e Hou, 2009).

4.1.1.4 Grau de hidrólise e métodos para sua determinação

A extensão da proteólise pode ser avaliada pelo grau de hidrólise (GH), referente à percentagem de clivagem das ligações peptídicas de uma proteína e é considerado o meio mais prático e conveniente para controlar o processo de hidrólise (Adler-Nissen, 1986). O GH é também o melhor indicador para comparar diferentes amostras de hidrolisados proteicos visto que é o principal determinante das propriedades dos hidrolisados (Adler-

Nissen, 1986). A avaliação do GH depende de três princípios básicos: do teor de azoto libertado pela hidrólise da proteína, na presença de um agente precipitante; da determinação de grupos amino livres e da titulação de prótons libertados.

De modo a minimizar os efeitos adversos da proteólise e assegurar as características funcionais desejadas, o grau de hidrólise varia e deve ser controlado (Schlothauer *et al.*, 2005): elevado grau de hidrólise (com 90 % dos peptídeos com massa molecular inferior a 500 Da) para aplicações em formulações especiais, destinados à nutrição clínica (por exemplo, hidrolisados hipoalergénicos); baixo grau de hidrólise (com 90 % dos peptídeos com massa molecular superior a 5000 Da) e grau de hidrólise moderado, (46 % dos peptídeos com massa molecular superior a 5000 Da) para desenvolvimento de suplementos nutricionais (Mahmoud, 1994).

Existem vários métodos para medir o GH, variando na sua complexidade, precisão e exatidão. Os métodos mais vulgarmente aplicados incluem: 1) a medida da solubilidade em ácido tricloroacético (TCA), 2) a reação com ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS), onde os grupos α -amino livres formados reagem com este ácido, sendo a reação detetável espectrofotometricamente, utilizando-se uma solução do aminoácido leucina como padrão e 3) a técnica de *pH-stat*, que quantifica, por titulação, a variação do número de prótons livres ao longo do processo. Esta técnica fundamenta-se no princípio de que quando a reação enzimática ocorre a valores de pH fora da faixa do *pK* do grupo amino ou carboxilo, haverá um aumento do consumo de base ou ácido, a fim de titular estes grupos. Portanto, se o pH é mantido constante, o consumo de base ou ácido será proporcional ao número de ligações peptídicas clivadas (Adler-Nissen, 1986). Este método permite a monitorização da hidrólise mas é relativamente inútil na caracterização dos hidrolisados produzidos.

4.1.2 Propriedades funcionais de hidrolisados de proteínas de soja

Embora as propriedades funcionais dos hidrolisados de proteínas de soja, mais concretamente as propriedades espumantes, emulsionantes e solubilidade, tenham sido objeto de vários estudos, na realidade poucos se dedicaram à análise da capacidade gelificante dos hidrolisados bem como de possíveis estratégias para melhorar esta propriedade.

Apresenta-se, de seguida, um resumo sobre o conhecimento atual do efeito da proteólise nas propriedades gelificantes e emulsionantes das proteínas de soja uma vez que foram as principais propriedades funcionais analisadas neste capítulo da tese.

As propriedades gelificantes das proteínas de soja são claramente afetadas pela hidrólise enzimática constatando-se uma diminuição desta capacidade com a proteólise (Panyam e Kilara, 1996; Lamsal *et al.*, 2006). O aumento do número de grupos ionizáveis na proteína, em virtude da modificação enzimática, resulta no aumento da repulsão entre os péptidos e consequente decréscimo da capacidade gelificante (Panyam e Kilara, 1996). A rigidez do gel dos hidrolisados de proteína de soja mostrou ser dependente da enzima utilizada (Hrckova *et al.*, 2002) bem como do grau de hidrólise (Lamsal *et al.*, 2006), com um decréscimo do valor do módulo de armazenamento com o aumento do GH, após aquecimento a 95 °C. Lamsal *et al.* (2006) verificaram que a temperatura de gelificação dos hidrolisados, com grau de hidrólise de 2 e 4 %, foi ligeiramente inferior à da amostra controlo tendo estes hidrolisados mantido alguma da capacidade gelificante. Contudo, valores de GH superiores a 4 % resultaram numa redução da capacidade gelificante dos hidrolisados que variou entre 6 e 75 vezes comparativamente com as amostras não hidrolisadas. O tipo de substrato utilizado (isolado, concentrado e farinha de soja) não apresentou influência na rigidez do gel obtido porque os hidrolisados apresentavam um perfil peptídico muito semelhante.

A bibliografia relata que as diferentes subunidades constituintes das proteínas de soja têm diferente sensibilidade à proteólise (Ortiz e Añón, 2000; Hrcková *et al.*, 2002). A β -conglícinina é mais facilmente degradada do que a glicinina e, para além disso, o polipéptido B da glicinina é degradado mais lentamente do que o A (Hrcková *et al.*, 2002), possivelmente porque o primeiro tem maior tendência para formar grandes complexos insolúveis o que diminui a suscetibilidade à hidrólise enzimática.

No que se refere às propriedades emulsionantes, a protease utilizada e o GH são determinantes para o efeito da hidrólise enzimática: Graus de hidrólise baixos favorecem a capacidade emulsionante mas o seu progressivo aumento resulta no efeito contrário (Tsumura *et al.*, 2005; Zhao e Hou, 2009; Zhang *et al.*, 2012) pelo que se pode concluir

que a hidrólise extensiva das proteínas destrói a sua capacidade emulsionante. O aumento da hidrofobicidade e da solubilidade desencadeado pela proteólise limitada provavelmente contribui para o aumento da capacidade emulsionante (Qi *et al.*, 1997). Por outro lado, a estabilidade da emulsão decresce com o progressivo aumento do grau de hidrólise (Qi *et al.*, 1997). A redução da viscosidade da fase contínua devido à diminuição do tamanho dos péptidos e a formação limitada de filmes interfaciais coesivos por adsorção de moléculas proteicas na interface foram apontadas como possíveis causas para a diminuição da estabilidade da emulsão com o aumento do GH (Qi *et al.*, 1997). A intensidade dos efeitos descritos mostrou ser dependente da enzima aplicada (Zhao e Hou, 2009) e do grau de proteólise da β -conglícinina (Tsumura *et al.*, 2005). No trabalho destes investigadores ficou mostrado o papel fundamental da β -conglícinina para a capacidade emulsionante a pH neutro.

Num estudo recente, Zhang *et al.* (2012) demonstraram que os hidrolisados dos conjugados de β -conglícinina-dextrano com GH de 2.2 % possuíam melhor capacidade emulsionante e maior estabilidade da emulsão do que a β -conglícinina e os conjugados β -conglícinina-dextrano. Por outro lado, o aumento do GH para 6.5 % desencadeou o efeito oposto, ou seja, a diminuição quer da capacidade emulsionante quer da sua estabilidade em virtude da diminuição acentuada da hidrofobicidade superficial provocada pela proteólise mais acentuada.

A capacidade de formação e estabilização de espumas é uma das propriedades funcionais dos hidrolisados de proteínas de soja mais estudadas. A solubilidade das proteínas e a hidrofobicidade aromática superficial influenciam determinantemente a capacidade dos hidrolisados formarem e estabilizarem espumas, embora a primeira apresente maior efeito (Ortiz e Wagner, 2002). Os vários trabalhos encontrados na literatura mostram que o aumento do grau de hidrólise provoca, de um modo geral, um aumento progressivo da solubilidade (Qi *et al.*, 1997; Tsumura *et al.*, 2005; Lamsal *et al.*, 2006) e uma perda gradual da capacidade de formação e estabilização de espumas (Ortiz e Añón, 2000). Saliente-se no entanto que o tratamento enzimático limitado melhora substancialmente a capacidade espumante (Ortiz e Wagner, 2002; Tsumura *et al.*, 2005; Martinez *et al.*, 2009), devido à exposição de grupos hidrofóbicos e aumento da flexibilidade molecular dos polipéptidos o que, por sua vez, aumenta a afinidade para a interface e a taxa de adsorção (Miñones Conde e Patino, 2006).

Embora existam alguns trabalhos descritos na literatura sobre a capacidade espumante e emulsionante dos hidrolisados enzimáticos das proteínas de soja, poucos trabalhos, para além dos reportados por Hrcková *et al.* (2002), Lamsal *et al.* (2006) e Zhong *et al.* (2007), exploraram a capacidade gelificante desses hidrolisados. Neste sentido, pretendeu-se colmatar esta falha e contribuir para o conhecimento do efeito do grau de hidrólise na capacidade de gelificação e emulsionante de um isolado de soja comercial, de baixa solubilidade, de forma a aumentar as suas possíveis aplicações industriais. Assim sendo, a hidrólise enzimática controlada surge como uma via de modificação estrutural que, em condições otimizadas, permitirá melhorar e diversificar as propriedades funcionais deste isolado. Por outro lado, pretendeu-se ainda avaliar a influência da incorporação de galactomananas, um polissacarídeo neutro não gelificante, e da massa molecular desse biopolímero, nas propriedades gelificantes e emulsionantes dos hidrolisados de soja obtidos definindo assim uma possível estratégia para o alargamento das propriedades funcionais dos hidrolisados obtidos.

4.2 Materiais e Métodos

4.2.1 Amostras

Para a realização do trabalho foi utilizado um isolado de proteína de soja comercial – *SAMPROSOY* 90 EG- (IPS5) gentilmente cedido pela Bunge Alimentos (Brasil). A galactomanana utilizada foi a goma de alfarroba (GA) fornecida pela DAVISCO (Faro, Portugal) devidamente purificada por precipitação em etanol, de acordo com o descrito na secção 3.2.2.1. Amostras de GA com diferente massa molecular foram obtidas como descrito em § 3.2.2.2.

4.2.2 Hidrólise enzimática do IPS

A enzima bromelina, uma endopeptidase, proveniente do abacaxi (Sigma-Aldrich), com atividade de 5.1 U/mg proteína, foi utilizada para efetuar a hidrólise enzimática do IPS. A enzima comercial liofilizada foi dispersa em tampão fosfato 0.01 mol/L a pH 8, com uma concentração de 0.8 mg/mL.

O método de dissolução do isolado proteico foi semelhante ao descrito em § 2.2.4.1 utilizando-se como solvente o tampão fosfato 0.01 mol/L pH 8. A concentração do isolado foi de cerca de 35 mg/mL.

A solução de enzima foi adicionada à dispersão de IPS na razão 4:1 (v/v) de acordo com o descrito por Ortiz e Wagner (2002) e a reação de hidrólise efetuada num recipiente fechado, o qual foi colocado num banho de água a temperatura constante de 40 °C (a esta temperatura, a atividade enzimática é máxima), sob agitação controlada e durante diferentes períodos de tempo.

De forma análoga, preparou-se uma amostra controlo à qual foi adicionado tampão fosfato 0.01 mol/L a pH 8 em volume equivalente ao adicionado de solução enzimática.

Aliquotas da mistura (dispersão IPS/dispersão enzimática) foram sendo removidas a diferentes tempos (5, 15, 30, 60, 120, 180 min) e imediatamente aquecidas a 100 °C durante 5 min, de acordo com o descrito por Kumar *et al.* (2004), de forma a desnaturar a enzima e parar a reação de hidrólise. O pH da reação foi sendo monitorizado com medidor de pH de forma a manter o pH constante. Cada fração, incluindo a amostra controlo, depois de arrefecida à temperatura ambiente, foi congelada em azoto líquido e liofilizada.

4.2.3 Preparação de dispersões dos hidrolisados e misturas com goma de alfarroba

As dispersões dos hidrolisados de proteína de soja obtidos e das misturas com GA foram preparadas seguindo os procedimentos descritos em § 3.2.3.2 e 3.2.3.3.

4.2.4 Caracterização dos hidrolisados enzimáticos obtidos

4.2.4.1 Determinação do grau de hidrólise

Para determinação do GH utilizou-se o método TNBS, como descrito por Adler-Nissen (1979) e Spellman *et al.* (2003) e aplicado por Ryan *et al.* (2008) para proteínas de soja.

A cada amostra de hidrolisado foi adicionado tampão fosfato de sódio pH 8.2 e TNBS 1 mg/mL (preparado em água ultrapura). A mistura foi agitada e incubada a 50 °C durante 1 h no escuro. Adicionou-se HCl 1 mol/L, para parar a reação, e a mistura foi mantida em repouso por 30 min à temperatura ambiente num local escuro. De seguida, as absorvâncias

foram lidas a 340 nm num espectrofotômetro *Jenway 6405 UV/Vis spectrophotometer*. As medidas foram realizadas a temperatura ambiente e em triplicado.

Os valores de GH foram calculados com base na equação 4.1:

$$GH (\%) = \frac{AN_2 - AN_1}{Npb} \quad (4.1)$$

onde, AN_2 corresponde ao conteúdo de grupos amino do substrato proteico antes da hidrólise (mg/g proteína), AN_1 ao conteúdo de grupos amino após hidrólise e Npb ao conteúdo de azoto das ligações peptídicas no substrato (mg/g proteína). Os valores AN_1 e AN_2 foram obtidos através de uma curva de calibração utilizando soluções de L-leucina, na gama de concentrações 0.5 mmol/L a 1.75 mmol/L.

4.2.4.2 Solubilidade dos hidrolisados

A quantificação das proteínas solúveis em água ultrapura foi efetuada utilizando o método do ácido bicinonínico (BCA) seguindo o protocolo descrito em § 2.2.3.6.

A solubilidade proteica foi expressa como a razão entre a proteína solúvel e a proteína total determinada por análise elementar.

4.2.4.3 Turbidez dos hidrolisados

Prepararam-se dispersões dos hidrolisados liofilizados, em água ultrapura, com uma concentração de 5 mg/mL. As dispersões foram mantidas, sob agitação, por 1 h à temperatura ambiente e de seguida determinada a absorvância a 600 nm em espectrofotômetro *JenWay 6405 UV/Vis*.

4.2.4.4 Distribuição de tamanhos de partículas

Dispersões dos hidrolisados (0.5 mg/mL) foram preparadas em água ultrapura e foram mantidas em agitação durante 2 h à temperatura ambiente. As dimensões das partículas constituintes das amostras foram determinadas no equipamento *ZetaSize nanoseries* (Malvern), em cuvette de plástico. Os ensaios de DLS foram realizados a um ângulo de

deteção de 90° de forma a fornecer informações sobre o tamanho hidrodinâmico das partículas.

4.2.4.5 Análise dos hidrolisados por espectroscopia de infravermelho (FT-IR)

A análise por espectroscopia de infravermelho foi realizada como anteriormente descrito em § 2.2.3.8. Os espectros de FT-IR foram submetidos a uma regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) com o *software CATS* desenvolvido por Barros (1999).

O método de PLS é usado para calibração multivariada onde as variáveis dependentes, Y (dados analíticos), intervêm diretamente na decomposição, em componentes principais, das variáveis independentes, X (espectros). Neste método, pretende-se determinar um número pequeno de variáveis latentes ou fatores que possibilitem a previsão de Y, ou seja de valores analíticos, o mais eficientemente possível, usando os valores contidos em X. O PLS utiliza assim fatores responsáveis pela maior variância de dados e ao mesmo tempo sejam os que permitem uma correlação máxima entre as variáveis originais e previstas, maximizando a covariância dos dados.

4.2.4.6 Análise por microscopia eletrónica de varrimento

As amostras dos hidrolisados liofilizados foram trituradas e espalhadas nos suportes de alumínio preparado com adesivo de carbono e revestidas com pó de ouro sob vácuo. A análise microscópica realizou-se em microscópio eletrónico *Hitachi SU 4100*, operado a 15 kV.

4.2.4.7 Avaliação da capacidade gelificante dos hidrolisados e das misturas hidrolisados/GA

Os métodos reológicos foram realizados em reómetros de tensão controlada, *Bohlin CVO 120HR* (Figura 3.3) e *TA-AR1000* (Figura 3.4), equipados com sistemas de *Peltier* de controlo de temperatura e sistemas de medida cone-placa e placa-placa, dependendo do tipo de ensaio.

Para a caracterização dos géis dos hidrolisados de IPS e de misturas de hidrolisados de IPS com GM realizaram-se dois tipos de ensaios reológicos, como já referido em § 3.2.5.2.2:

ensaios de varrimento em temperatura, onde se variou a temperatura a que a amostra estava sujeita e ensaios isotérmicos a 80 °C. No primeiro caso utilizou-se como sistema de medida uma geometria placa-placa com uma placa superior com 40 mm de diâmetro e, no segundo, um cone em aço inoxidável de diâmetro 40 mm e ângulo 4°.

Foram preparadas soluções dos hidrolisados e/ou das misturas hidrolisados/GA com uma concentração de proteína de 12 % e de polissacarídeo de 0.3 % (determinada por resíduo seco) seguindo o procedimento descrito em 3.2.3.1, 3.2.3.2 e 3.2.3.3. De forma a ser possível avaliar o efeito do GH na capacidade gelificante dos hidrolisados das proteínas de soja, selecionou-se a concentração de 12 %, para a qual todos os hidrolisados em estudo conseguiram gelificar. Por outro lado, tendo em conta a viscosidade da dispersão do IPS controlo e da GA não foi possível, experimentalmente, trabalhar com a concentração de 0.5 % de GA, estudada anteriormente no capítulo 3, pelo que se realizaram as misturas a uma concentração de polissacarídeo de 0.3 %, correspondente à concentração máxima de polissacarídeo que se conseguiu adicionar às dispersões das proteínas.

As amostras, após homogeneização e desgaseificação, foram colocadas na placa inferior do reómetro a 40 °C e de seguida fez-se aumentar a temperatura até 95 °C a uma velocidade de 1 °C/min, registando-se a evolução dos módulos viscoelásticos em função da temperatura, a uma frequência de oscilação de 5 rad/s e 1 % de deformação. O valor da deformação foi selecionado com base em resultados de ensaios de varrimento em deformação que permitiram identificar a zona de comportamento viscoelástico linear. No final da rampa ascendente de temperatura, manteve-se a temperatura a 95 °C durante 10 min e de seguida fez-se descer a temperatura até 20 °C nas mesmas condições de velocidade, frequência e deformação da rampa ascendente de temperatura. Atingindo os 20 °C fez-se um varrimento em frequência de 0.05 a 50 rad/s.

Para a realização dos ensaios isotérmicos, as amostras foram colocadas na placa inferior a uma temperatura de 40 °C e, após baixar o cone, a temperatura foi rapidamente elevada até 80 °C. A evolução dos módulos viscoelásticos foi registada durante 3 h, nas mesmas condições de frequência de oscilação e de amplitude de deformação usadas nos ensaios não isotérmicos. Imediatamente a seguir, efetuou-se um varrimento em frequência a 80°C na gama de frequências 0.05-50 rad/s. Em todos os ensaios efetuados, quer isotérmicos quer

não isotérmicos, a superfície da amostra exposta foi coberta por uma fina camada de óleo mineral de baixa viscosidade, a fim de evitar qualquer evaporação de solvente.

Todos os ensaios foram realizados, no mínimo, em triplicado.

4.2.4.8 Avaliação da capacidade emulsionante dos hidrolisados e das misturas hidrolisados/GA

O índice da atividade emulsionante (IAE) e o índice de estabilidade da emulsão (IEE) foi determinado de acordo com o descrito por Wang *et al.* (2008). Para a formação da emulsão, misturou-se 6 mL da dispersão de IPS controle, hidrolisados ou misturas, preparada a 0.2 % em tampão Tris-HCl 0.05 mol/L (pH 7.5), com 2 mL de óleo de soja e homogeneizou-se, num Ultraturrax T25 basic IKA-Werke, durante 1 min à velocidade máxima (≈ 17500 rpm). Uma alíquota (50 μ L) da emulsão foi retirada do fundo, imediatamente após a homogeneização (0 min) e após 10 min, sendo diluída (1:100, v/v) numa solução 0.1 % (m/v) de SDS. Após mistura em vortex, a absorvância das emulsões diluídas foi lida a 500 nm num espectrofotômetro *Jenway 6405 UV/Vis spectrophotometer*. O IAE e o IEE foram calculados através da aplicação das equações 4.2 e 4.3:

$$\text{IAE (m}^2/\text{g)} = \frac{2 \times 2.303 \times A_0 \times FD}{C \times \phi \times 10000} \quad (4.2)$$

$$\text{IEE (min)} = \frac{A_0}{A_0 - A_{10}} \times 10 \quad (4.3)$$

onde FD é o fator de diluição (100), C a concentração inicial de proteína (g/mL), ϕ o comprimento ótico (0.01 m), θ a fração de óleo utilizada para a formação da espuma (0.25), e A_0 e A_{10} a absorvância das emulsões diluídas a 0 e 10 min, após a homogeneização, respetivamente. As medidas foram efetuadas em triplicado.

4.2.4.9 Análise estatística

Todas as determinações foram efetuadas, no mínimo, em triplicado. Os resultados das determinações efetuadas foram expressos em termos das médias das três réplicas e dos respectivos desvios-padrão, à exceção dos obtidos por análises reológicas. Os valores médios obtidos foram comparados recorrendo ao teste *t-student*. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0.05$.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Caracterização dos hidrolisados enzimáticos obtidos

4.3.1.1 Grau de hidrólise e solubilidade dos hidrolisados

A solubilidade das proteínas de soja presentes nos isolados comerciais é frequentemente baixa devido, nomeadamente, ao tratamento térmico durante o processamento e obtenção desses isolados. Por outro lado, a solubilidade dessas proteínas é uma característica determinante para a sua aplicabilidade em sistemas alimentares, pelo que a sua avaliação reveste-se de grande importância. A hidrólise enzimática parcial dessas proteínas surge como uma boa alternativa para melhorar a dispersibilidade e a solubilidade das proteínas de soja, aumentando assim as possíveis aplicações dos isolados comerciais.

No estudo agora realizado e de forma a ser possível monitorizar a hidrólise a que as proteínas foram sujeitas, determinou-se o grau de hidrólise (GH) bem como a solubilidade dos hidrolisados obtidos (Figura 4.1). Embora o GH aumente com o decorrer da reação enzimática, observa-se que a taxa de crescimento é bastante mais acentuada nos primeiros 30 min de reação (Figura 4.1), o que permite inferir que as proteínas de soja são preferencialmente hidrolisadas nos primeiros tempos de reação, com a hidrólise a prosseguir lentamente nos tempos subsequentes.

Em termos absolutos, os valores de GH obtidos diferem ligeiramente dos reportados na bibliografia para condições experimentais equivalentes (Ortiz e Wagner, 2002). Como se sabe, para as mesmas condições experimentais, o GH depende do grau de desnaturação da proteína.

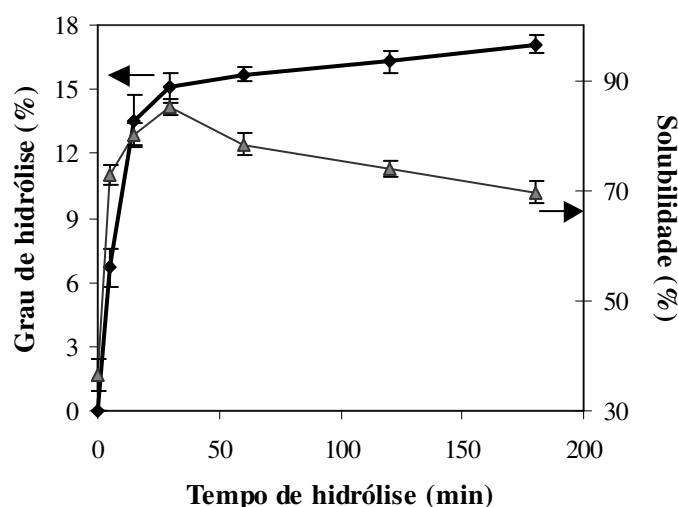


Figura 4.1 – Valores de graus de hidrólise e de solubilidade dos hidrolisados de proteínas de soja com o decorrer do tempo de proteólise

A discrepância de valores encontrada pode resultar do efeito do diferente processamento pré-submetido às amostras de IPS: proteínas submetidas a tratamentos que provoquem a rutura da estrutura terciária, apresentam hidrólise enzimática mais rápida e efetiva. A exposição de um maior número de sítios específicos para a clivagem enzimática, anteriormente escondidos no interior da molécula, pode assim explicar este comportamento.

Contrariamente ao esperado, a solubilidade não aumenta monotonamente com o tempo de hidrólise: observa-se um aumento nos primeiros 30 min seguido de um decréscimo com o decorrer da reação, sugerindo a ocorrência de agregação entre segmentos peptídicos, possivelmente por via hidrofóbica. Trabalhos reportados na bibliografia corroboram esta hipótese (Inouye *et al.*, 2002; Nagai e Inouye, 2004; Kuipers *et al.*, 2007; Lv *et al.*, 2009). A agregação poderá ocorrer durante a reação de hidrólise (Inouye *et al.*, 2002; Nagai e Inouye, 2004; Kuipers *et al.*, 2007) ou até mesmo na fase de liofilização e armazenamento da amostra (Lv *et al.*, 2009). O modo de ação da protease utilizada é também determinante para a ocorrência ou não de agregação bem como a percentagem dos locais de clivagem nas regiões hidrofóbicas. Kuipers *et al.* (2007) demonstraram que, a pH neutro, a proteólise de proteínas de soja com subtilisina Carlsberg, quimiotripsina, bromelina e papaina originou processos de agregação fortes, o que não foi observado na hidrólise com tripsina. Os resultados obtidos foram relacionados com os locais de corte das enzimas: a tripsina

cliva preferencialmente próximo de aminoácidos hidrofílicos enquanto que a quimiotripsina, cliva próximo de aminoácidos hidrofóbicos. Segundo estes autores, a elevada abundância de locais teóricos de clivagem nas regiões hidrofóbicas da glicinina explica a forte exposição de grupos hidrofóbicos suscetíveis de sofrerem agregação nas proteínas de soja.

4.3.1.2 Turbidez dos hidrolisados

Analizou-se ainda, com o decorrer do tempo de reação, a turbidez das dispersões dos hidrolisados por leitura espectrofotométrica a 600 nm (Figura 4.2). A turbidez diminuiu progressivamente durante os primeiros 30 min de hidrólise observando-se de seguida uma tendência para o aumento dos valores sem no entanto atingir o da amostra controle.

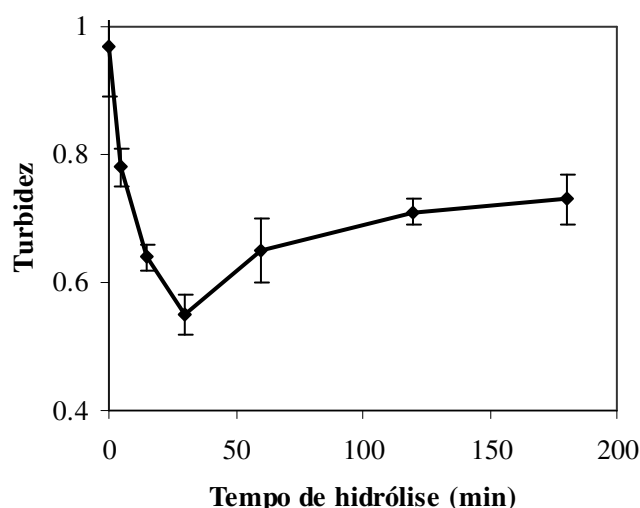


Figura 4.2 – Valores de turbidez (absorvância a 600 nm) de dispersões dos hidrolisados de proteínas de soja (5 mg/mL) com o decorrer do tempo de proteólise

Os resultados obtidos estão de acordo com a variação de solubilidade anteriormente discutida, apoiando a hipótese da formação de agregados entre segmentos peptídicos posteriormente à fase de hidrólise mais acentuada (após os primeiros 30 min).

Segundo Inouye *et al.* (2002) a turbidez das dispersões de hidrolisados refletem as propriedades coloidais das proteínas de soja e dos agregados formados. Este parâmetro foi utilizado por Inouye *et al.* (2002) e Nagai e Inouye (2004) para monitorizar a coagulação do isolado de proteína de soja por ação da subtilisina Carlsberg. Neste trabalho foram

definidos três fases no decorrer da reação: uma fase inicial (fase 1) onde a turbidez decresceu até um valor mínimo (com duração de 15-20 min), como resultado da digestão da proteína e sem ocorrência de agregação, seguida de um aumento drástico, até aproximadamente 60-70 min, resultante da ocorrência de coagulação e de uma taxa de hidrólise da proteína mais lenta (fase 2). Por fim, registaram uma ligeira diminuição da turbidez em virtude de uma digestão secundária dos agregados formados. A variação da turbidez entre a fase 1 e 2 bem como o tamanho dos agregados mostrou ser diretamente proporcional à concentração do IPS. No trabalho realizado por Fuke *et al.* (1985) foi também demonstrada a ocorrência de coagulação de proteínas de soja por tratamento com bromelina.

4.3.1.3 Tamanho de partículas constituintes dos hidrolisados

De forma a estimar o tamanho dos fragmentos constituintes dos hidrolisados obtidos foram realizados ensaios de DLS (*dynamic light scattering*) cujos resultados são apresentados na Figura 4.3.

Na Figura 4.3 A, correspondente à amostra que não sofreu hidrólise, observa-se um único pico, ao passo que as Figuras 4.3 B, C e D mostram claramente que a hidrólise das proteínas do IPS com a bromelina originou a formação de fragmentos de menores tamanhos, tal como se pode comprovar pela diminuição da intensidade do pico correspondente ao IPS controlo (A) e pelo aparecimento de novos picos de tamanhos inferiores ao registado em (A): para $t=5$ min (Figura 4.3 B), verifica-se a existência de dois picos, um com tamanho próximo ao pico do IPS controlo e outro com tamanho inferior e cuja intensidade é menor do que a do pico correspondente à fração de maior tamanho (A). Para $t=15$ min (Figura 4.3 C), ocorre uma inversão da intensidade dos picos e o estreitamento do pico correspondente ao IPS controlo, o que sugere que a estrutura inicial está a ser progressivamente alterada.

Para $t=30$ min (Figura 4.3 D), observam-se 4 picos todos correspondentes a tamanhos inferiores ao do IPS controlo e a intensidade continuou a diminuir denotando a degradação da estrutura inicial e a prevalência de péptidos de menores tamanhos. Quando se analisa a Figura 4.3 E, correspondente a 60 min de hidrólise, já não se observa grande diferença do pico referente ao IPS controlo, sugerindo que possivelmente a estrutura já não apresenta

locais de corte disponíveis e/ou a ação da enzima é já mais lenta. Por outro lado, os picos de tamanho intermédio já não são bem definidos e independentes sugerindo a formação de agregados entre os fragmentos correspondentes. No seguimento da hidrólise, volta a aumentar o pico por volta dos 1000 nm sugerindo a existência de estruturas de maiores tamanhos resultantes possivelmente da ocorrência de agregação (figura 4.3 F).

Ao fim de 180 min de reação surgem apenas 3 picos, dos quais dois não são independentes constatando-se uma ligeira tendência para o aumento da intensidade do pico a 1000 nm.

Em suma e corroborando os resultados anteriores, constatou-se que o processo de hidrólise ocorreu essencialmente nos primeiros 30 min, em virtude do aparecimento de um maior número de picos de menores tamanhos. A partir dos 30 min a hidrólise tornou-se um processo mais lento uma vez que não se observaram picos correspondendo a dimensões inferiores às registadas e, para além disso, verificou-se um aumento dos picos de tamanhos intermédios sugerindo a formação de agregados entre os péptidos formados.

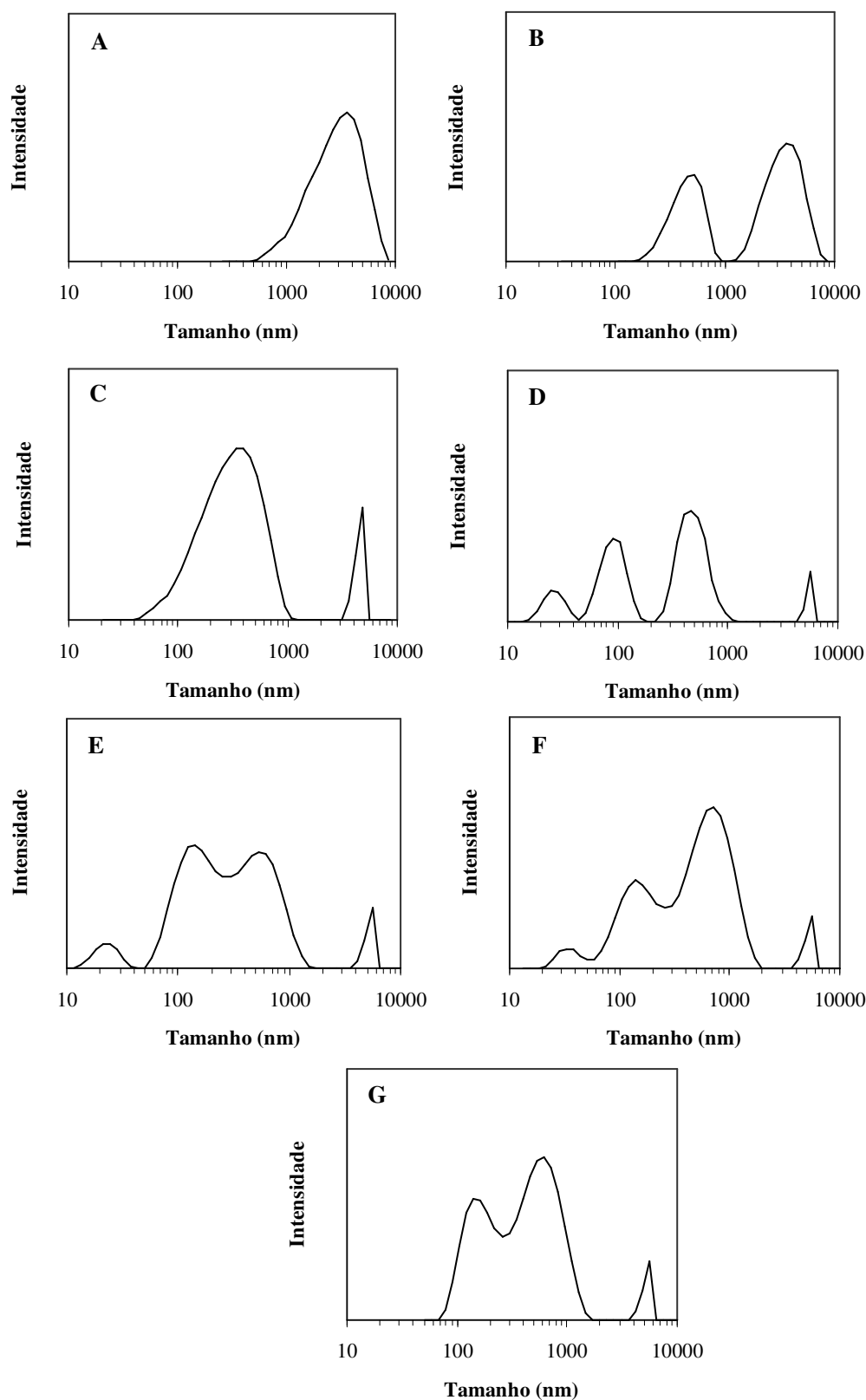


Figura 4.3 – Distribuição de tamanhos dos fragmentos constituintes dos hidrolisados de soja obtidos por hidrólise enzimática com bromelina por diferentes tempos: controle (A), 5 min (B), 15 min (C), 30 min (D), 60 min (E), 120 min (F) e 180 min (G)

4.3.1.4 Análise quimiométrica dos espectros de FT-IR

Na Figura 4.4 apresentam-se, a título exemplificativo, os espectros de FT-IR das amostras de IPS controlo e dos hidrolisados obtidos após 5 e 120 min de hidrólise com bromelina nas condições descritas em § 4.2.2.

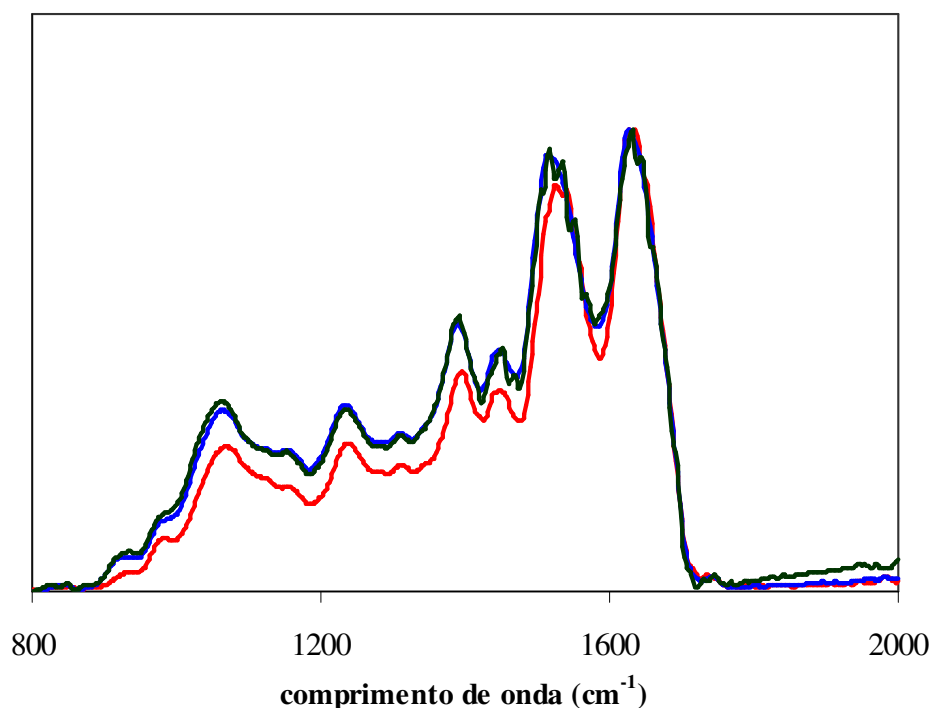


Figura 4.4- Espectros de FT-IR do IPS controlo (vermelho) e dos hidrolisados de proteínas de soja obtidos após 5 min (azul) e 120 min (verde) de hidrólise com bromelina.

Na tentativa de relacionar as alterações estruturais resultantes da hidrólise parcial das proteínas de soja com os parâmetros de solubilidade, turbidez e GH até agora analisados, submeteram-se os espectros de FT-IR dos hidrolisados em estudo a uma análise em PLS (*partial least squares*) e representaram-se os valores calculados e previstos dos parâmetros GH (Figura 4.5 A), solubilidade (Figura 4.5 B) e turbidez (Figura 4.5 C), bem como o perfil do vetor b (Figuras 4.6- A, B e C) determinado por aplicação do modelo.

Os resultados obtidos revelam a existência de uma boa relação entre os parâmetros de GH, solubilidade e turbidez e as alterações estruturais evidenciadas pelos espectros de FTIR dos hidrolisados obtidos, com o coeficiente de correlação a variar entre 0.89 e 0.96, respetivamente. No caso de existir uma maior diversidade de tempos de hidrólise, seria

possível definir um modelo para prever, com base apenas nos espectros de FTIR, os valores de GH, solubilidade e turbidez

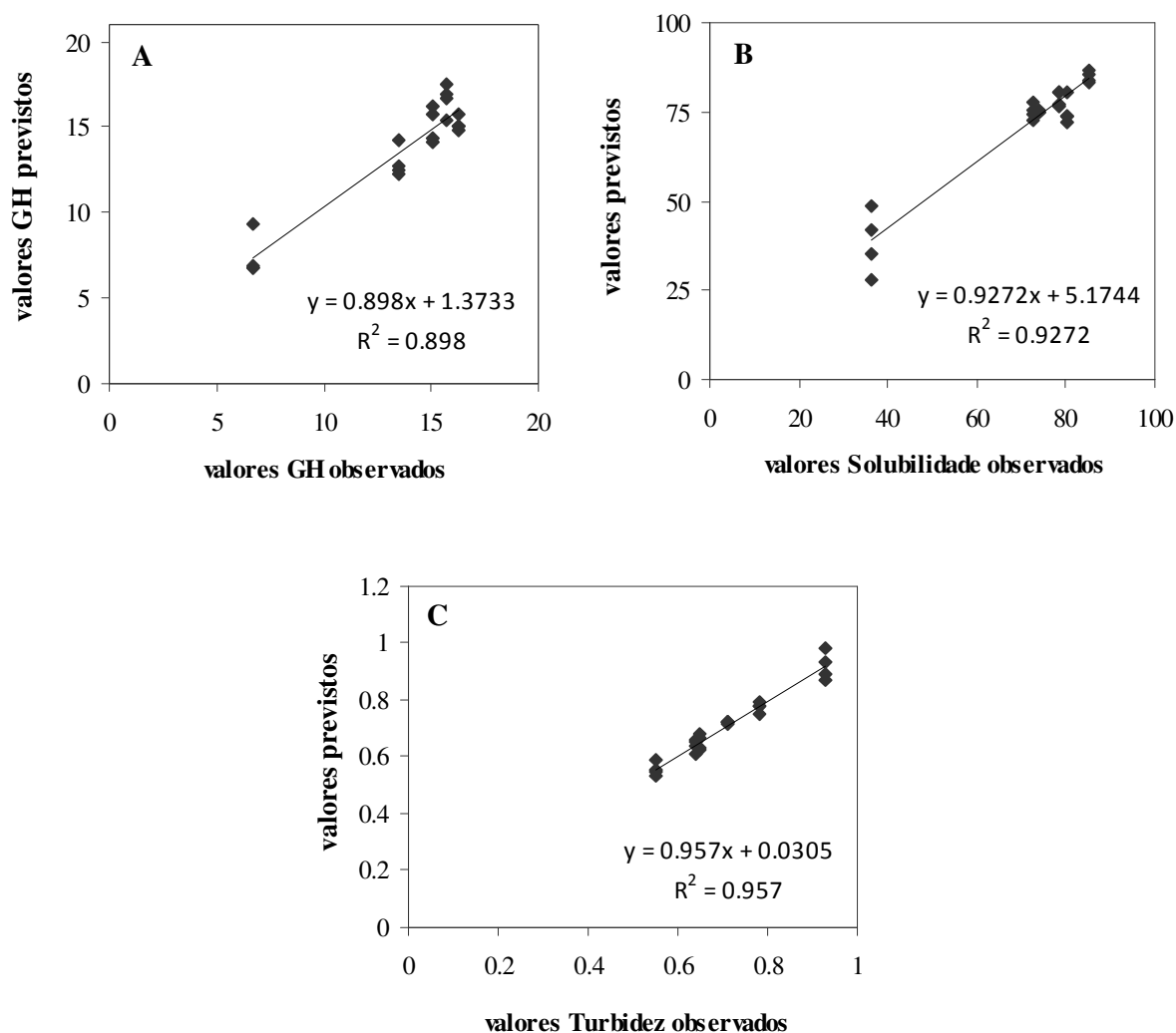


Figura 4.5 – Valores observados e previstos por aplicação do método PLS de GH (A), solubilidade (B) e turbidez (C) dos hidrolisados de proteínas de soja

O perfil do vetor b mostrou que o aumento do GH relacionou-se positivamente com as bandas a 1686 e 1620 cm^{-1} (Figura 4.6), associadas a alterações do estado de agregação (Tang e Ma, 2009) e com as bandas a 1654 e 1636 cm^{-1} , relacionadas, respetivamente, com estruturas em α -hélice e folhas β antiparalelas (Tang e Ma, 2009), demonstrando que a modificação enzimática das proteínas de soja promoveu processos de reorganização molecular.

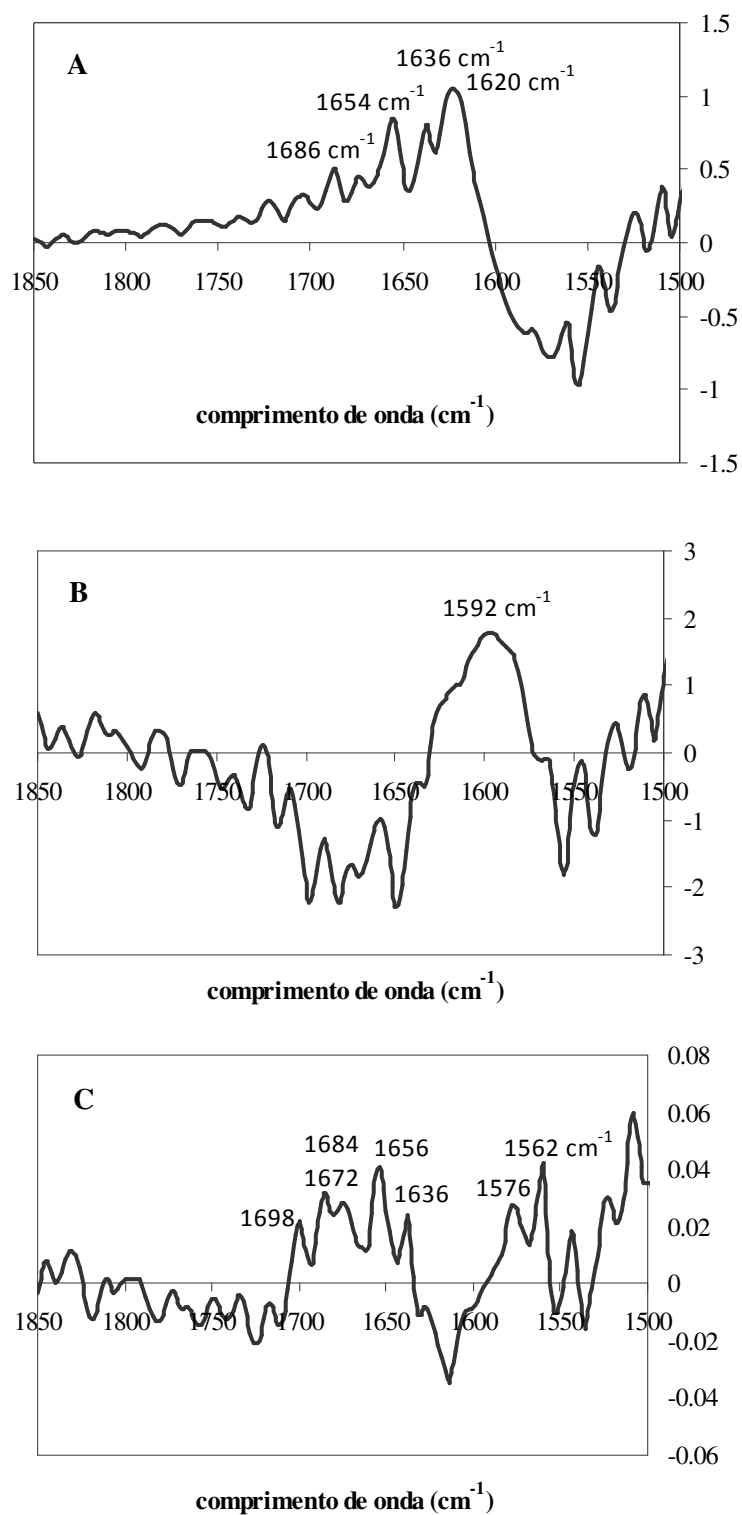


Figura 4.6 – Vetor b determinado por aplicação do método PLS aos espectros de FT-IR de GH (A), solubilidade (B) e turbidez (C) dos hidrolisados de proteínas de soja

A variação da solubilidade relacionou-se positivamente com a banda a 1592 cm^{-1} (Figura 4.6B) enquanto que a turbidez relacionou-se positivamente com as bandas a 1698 e 1684 cm^{-1} (Figura 4.6C), bandas estas associadas a processos de agregação e com as bandas a 1636 e 1656 cm^{-1} , associadas, respetivamente, com estruturas em folhas β antiparalelas e α -hélice (Tang e Ma, 2009). Foi possível relacionar as diferenças entre os espectros dos diferentes hidrolisados, resultantes das alterações estruturais promovidas pela hidrólise enzimática parcial, com as variações dos valores do GH, solubilidade e turbidez.

4.3.1.5 Microestrutura

As imagens obtidas por microscopia eletrónica de varrimento (MEV) permitiram visualizar alterações, em estruturas macromoleculares de proteínas, ocorridas com a progressão da hidrólise enzimática. A Figura 4.7 A mostra a microestrutura da amostra controlo, observando-se uma estrutura aglomerada filamentosa. Com o decorrer da proteólise até 30 min (Figuras 4.7 B, C e D), a estrutura torna-se progressivamente menos densa, verificando-se a formação de estruturas mais amorfas, menos filamentosas e de menores dimensões separadas por vacuolos de ar. Por outro lado, a partir da Figura 4.7 E observa-se a inversão destes efeitos, isto é, as partículas surgem cada vez mais próximas e com tamanhos maiores, observando-se na Figura 4.7 F e G o aparecimento de estruturas bastante aglomeradas. As alterações da microestrutura dos hidrolisados relacionam-se com os resultados obtidos de turbidez e solubilidade e confirmam que dependendo do tamanho associam-se de forma diferente quando sujeitas a liofilização e pulverização.

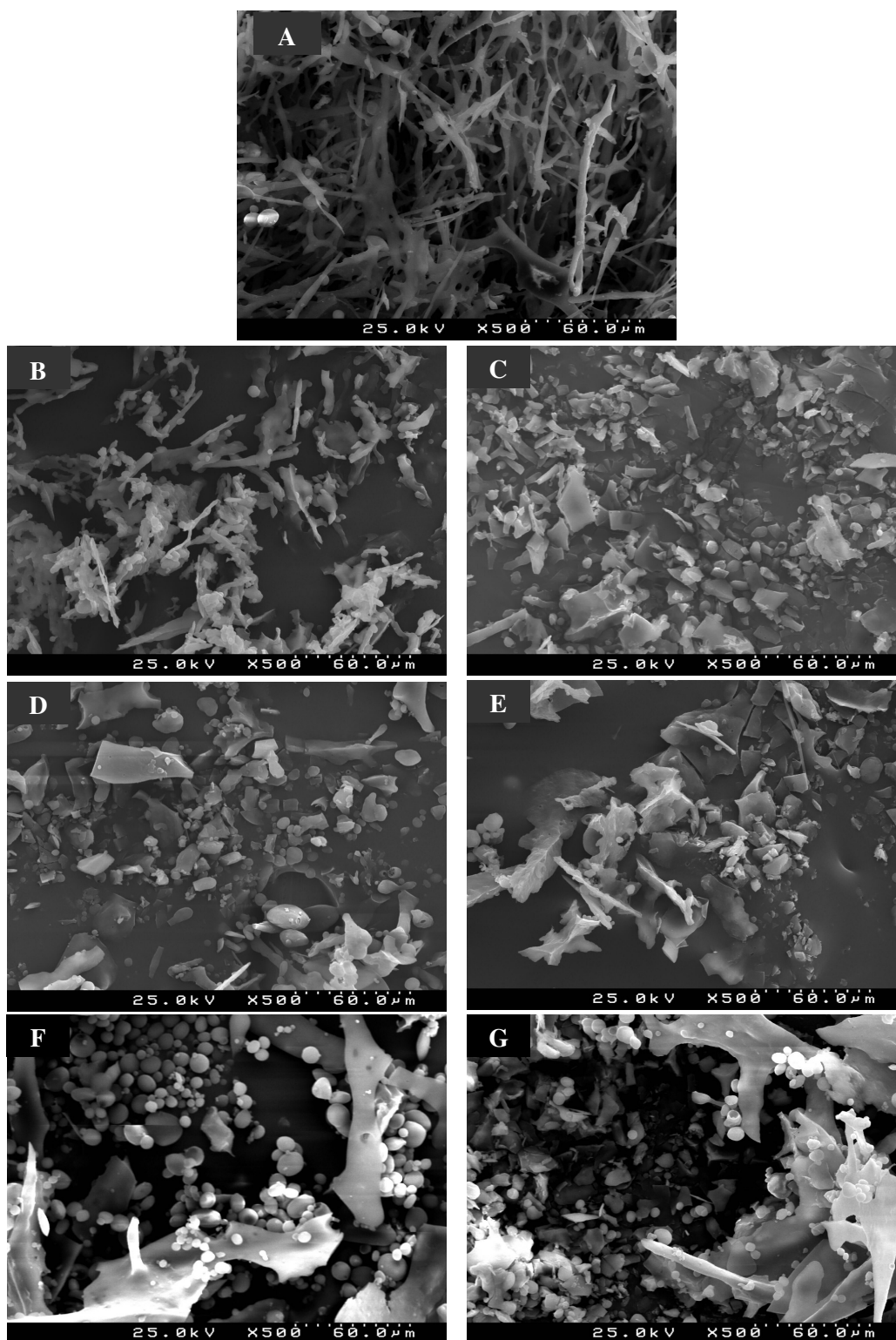


Figura 4.7 – Imagens de MEV do IPS controlo (A) e hidrolisados obtidos com diferentes tempos de hidrólise enzimática: 5 min (B), 15 min (C), 30 min (D) 60 min (E), 120 min (F) e 180 min (G). *Ampliação de 500 vezes.*

4.3.2 Capacidade gelificante dos hidrolisados enzimáticos obtidos e suas misturas com goma de alfarroba

Com esta parte do trabalho pretendeu-se estudar as propriedades gelificantes dos hidrolisados de proteínas de soja obtidos e avaliar o efeito da adição de GA nessas propriedades. Como objetivo secundário pretendeu-se investigar o efeito da massa molecular da galactomanana adicionada. Para atingir os objetivos referidos realizaram-se ensaios não isotérmicos e ensaios isotérmicos a 80 °C de acordo com o descrito em § 4.2.4.7.

4.3.2.1 Comportamento viscoelástico durante a formação do gel

Foram realizados ensaios de varrimento em temperatura para dispersões dos hidrolisados de proteína de soja a pH 7 e suas misturas com amostras de GA purificada (GA0). Estudaram-se dispersões de IPS e/ou respectivos hidrolisados com uma concentração de proteína de 12 % e com GA adicionada a uma concentração de 0.3 %.

De forma a facilitar a nomenclatura, os hidrolisados passarão a designar-se A, B, C, D, E e F respetivamente para os tempos de hidrólise 5, 15, 30, 60, 120 e 180 min.

Para os hidrolisados em estudo analisou-se a evolução dos módulos viscoelásticos em função da temperatura (Figura 4.8) durante a formação do gel. Tanto a amostra controlo como os diferentes hidrolisados obtidos evidenciaram, face à variação da temperatura, o comportamento típico do IPS já descrito noutras partes deste trabalho (capítulos 2 e 3).

As dispersões da amostra controlo e dos hidrolisados E e F mostraram, inicialmente e no início das rampas de aquecimento, G' maior do que G'' , corroborando a hipótese da existência de agregação nos hidrolisados de maior GH. Os hidrolisados A, B e C embora inicialmente exibam módulos viscoelásticos inferiores aos da amostra controlo, apresentam uma taxa de crescimento dos módulos maior e acabam por atingir valores finais superiores aos do IPS controlo. Esta observação contraria os resultados publicados por Lamsal *et al.* (2006), no qual os hidrolisados de IPS apresentaram menor capacidade gelificante à medida que aumentou o GH. Contudo, há que ter em atenção as diferenças entre os isolados de proteínas de soja utilizados bem como diferenças no GH atingido.

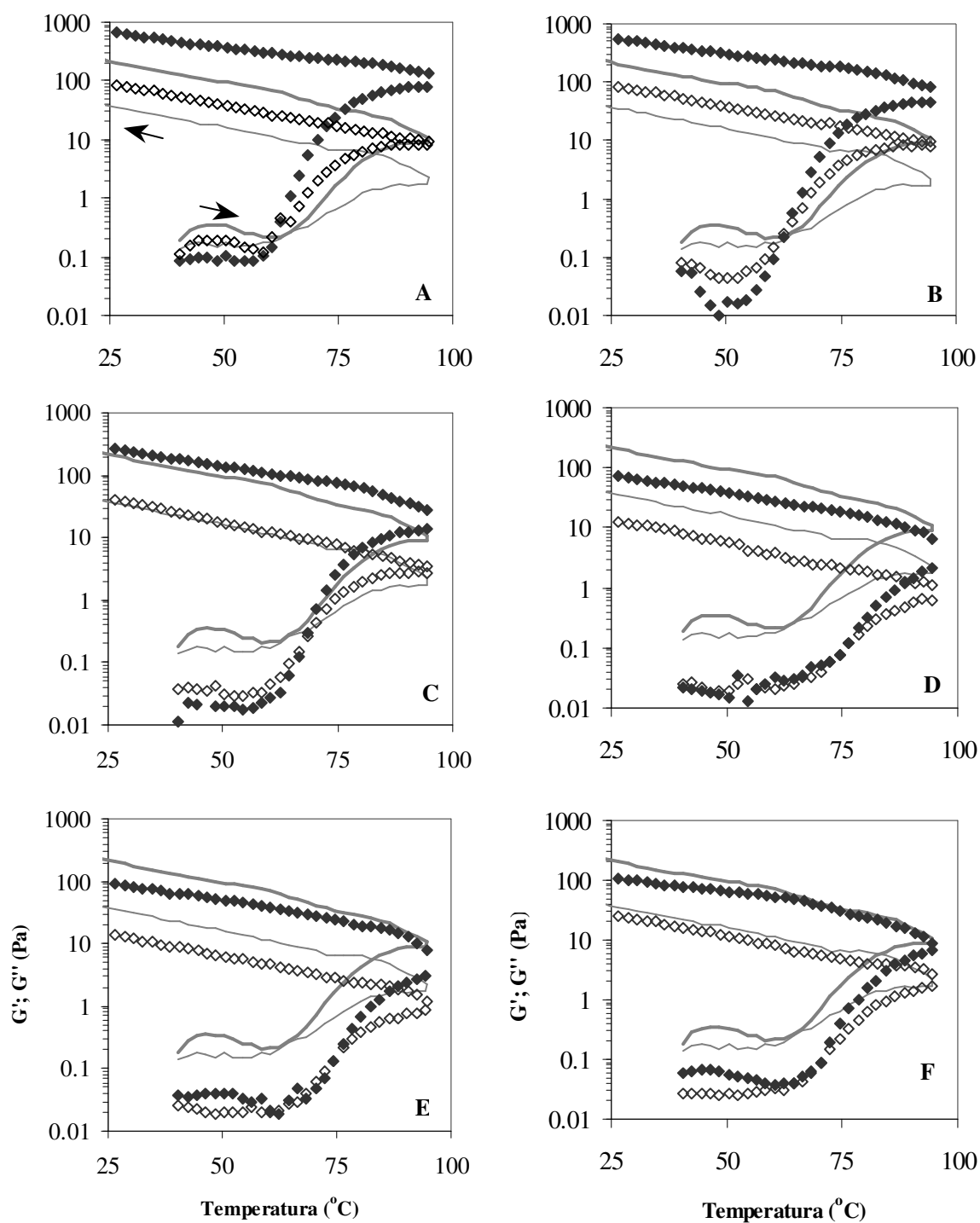


Figura 4.8 – Evolução dos módulos viscoelásticos (G' – símbolos fechados e linha grossa; G'' – símbolos abertos e linha fina) em função da temperatura, durante o aquecimento (40-95 °C) e arrefecimento (95-20 °C) *in situ* no reómetro, a uma taxa de 1 °C/min ($\omega=5$ rad/s, deformação de 1 %), da amostra controlo de IPS (linhas a cinzento) e amostras de IPS hidrolisadas (símbolos pretos), a uma concentração de proteína de 12 %, pH 7: (A) controlo e hidrolisado A (5 min de hidrólise); (B) controlo e hidrolisado B (15 min de hidrólise); (C) controlo e hidrolisado C (30 min de hidrólise); (D) controlo e hidrolisado D (60 min de hidrólise); (E) controlo e hidrolisado E (120 min de hidrólise) e (F) controlo e hidrolisado F (180 min de hidrólise).

O facto dos géis dos hidrolisados com menor GH serem mais rígidos do que os da amostra controlo pode dever-se ao facto da proteólise promover a abertura da estrutura proteica, inicialmente muito compacta, do IPS comercial expondo assim os grupos reativos, os quais mais facilmente e em maior número estabelecem ligações fundamentais para a formação e rigidez da rede tridimensional. Embora para os hidrolisados A, B e C se observe que os módulos viscoelásticos são superiores aos da amostra controlo, o que é certo é que ocorre o seu decréscimo para os valores mais elevados do GH em estudo (hidrolisados D, E e F) possivelmente como resultado da diminuição do tamanho das cadeias, o que diminui a rigidez das redes formadas.

Na Figura 4.9 representa-se apenas a variação do módulo de armazenamento com a temperatura durante a fase de aquecimento, de forma a ser possível comparar o efeito do GH na temperatura de gelificação.

A temperatura de gelificação (T_{gel}), considerada como a temperatura para a qual o módulo de armazenamento inicia um crescimento acentuado, apresenta a tendência para uma diminuição com o aumento do GH, mas aumenta para GH mais elevados (Figura 4.9 B), possivelmente devido ao menor tamanho das cadeias peptídicas e/ou à presença de agregados entre as cadeias o que diminuirá a taxa de desnaturação das proteínas constituintes destes hidrolisados.

Na Figura 4.10 representa-se a evolução dos módulos viscoelásticos com a temperatura, durante o aquecimento das dispersões proteicas com GA adicionada a 0.3 %. À semelhança do verificado no capítulo 3, a presença de GA fomentou a gelificação dos hidrolisados de proteínas de soja, aumentando os módulos viscoelásticos e diminuindo a temperatura de gelificação, efeito este dependente do GH.

Para comparação entre o início da gelificação induzida pelo aumento da temperatura entre as dispersões dos hidrolisados sem e com galactomananas, considerou-se a temperatura de gelificação aproximada como o valor correspondente ao cruzamento de G' e G'' após o início da subida brusca dos módulos, durante o aquecimento.

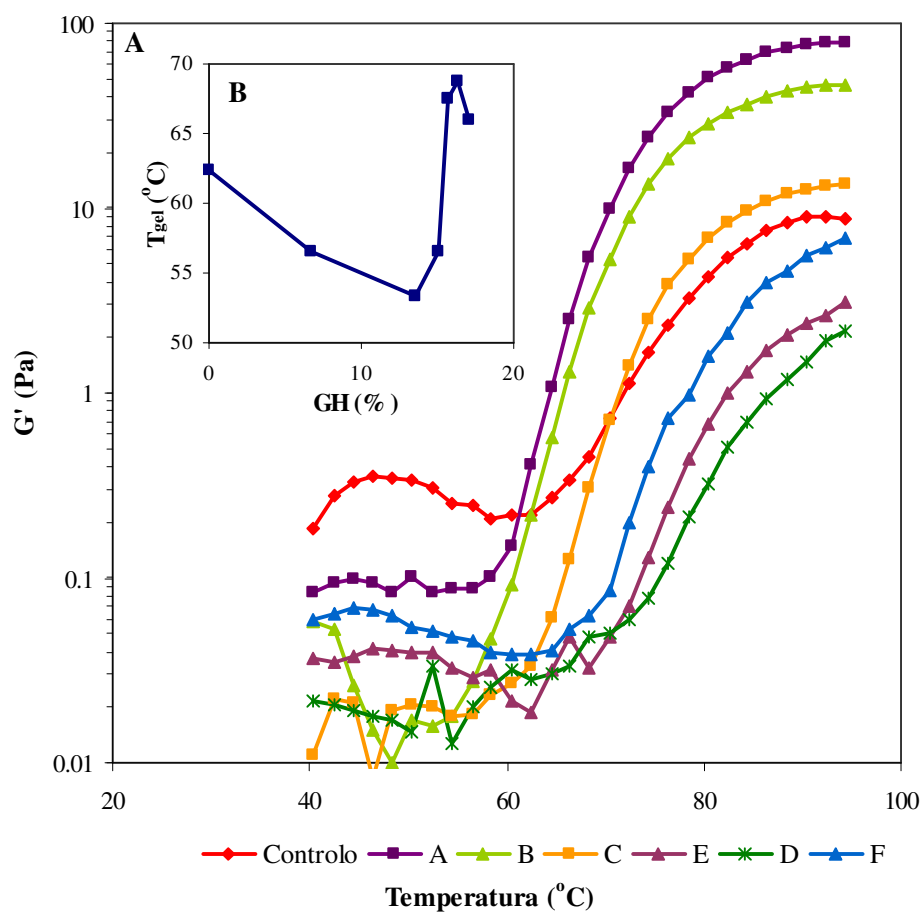


Figura 4.9 – Evolução do módulo de armazenamento durante o aquecimento (40-95 $^{\circ}\text{C}$) das amostras de IPS6 (controlo) e hidrolisados para uma concentração de proteína de 12 % a pH 7 (A) e variação da temperatura de gelificação (T_{gel}) com o tempo de hidrólise (B) e com o GH (C) da amostra controlo e hidrolisados.

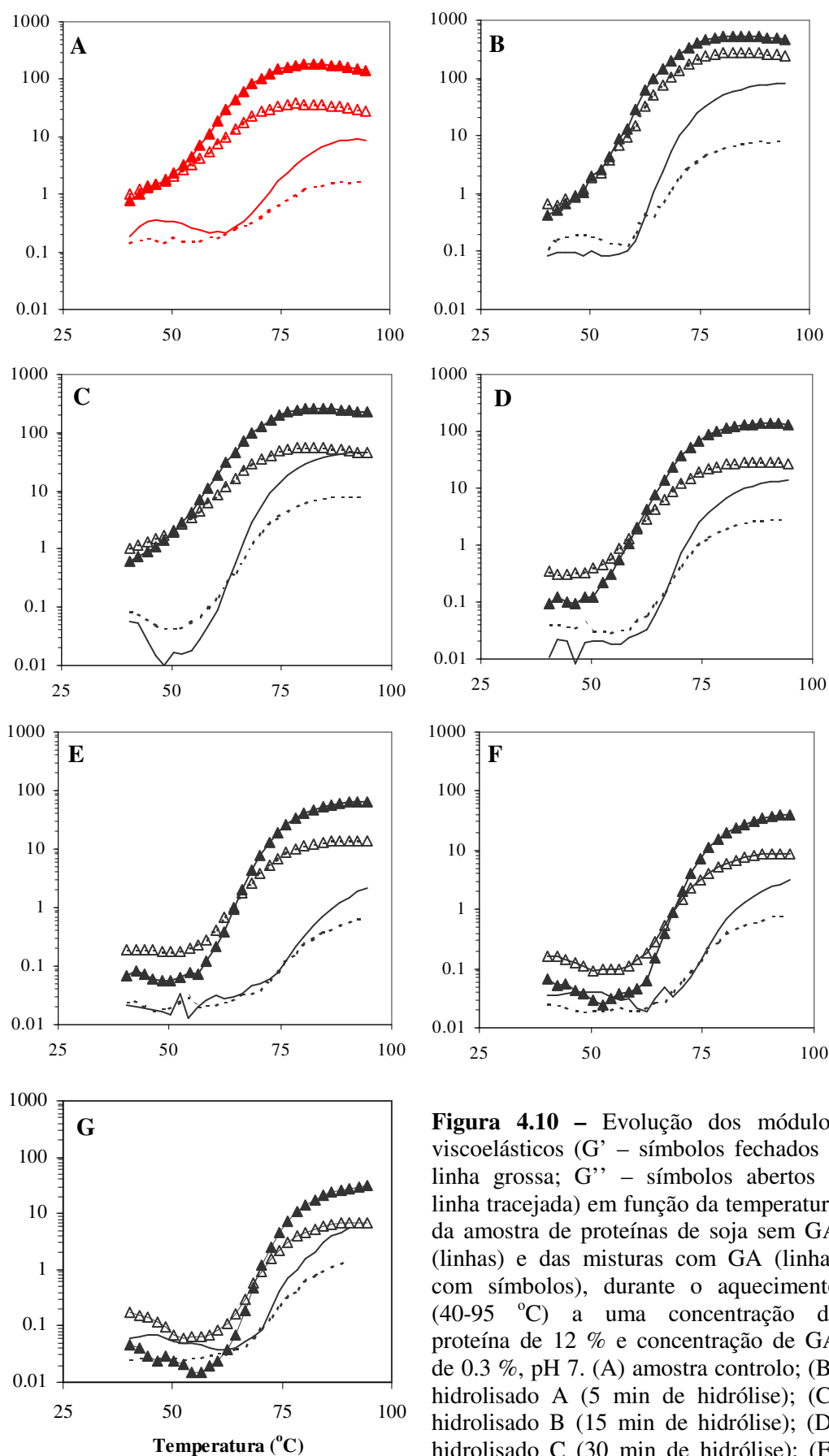


Figura 4.10 – Evolução dos módulos viscoelásticos (G' – símbolos fechados e linha grossa; G'' – símbolos abertos e linha tracejada) em função da temperatura da amostra de proteínas de soja sem GA (linhas) e das misturas com GA (linhas com símbolos), durante o aquecimento (40-95 °C) a uma concentração de proteína de 12 % e concentração de GA de 0.3 %, pH 7. (A) amostra controle; (B) hidrolisado A (5 min de hidrólise); (C) hidrolisado B (15 min de hidrólise); (D) hidrolisado C (30 min de hidrólise); (E) hidrolisado D (60 min de hidrólise); (F) hidrolisado E (120 min de hidrólise) e (G) hidrolisado F (180 min de hidrólise)

Na Figura 4.11A mostra-se a variação da T_{gel} com o tempo de hidrólise para as dispersões sem e com GA e em 4.11B a variação relativa de T_{gel} devido à adição de GA, mostrando-se nesta última que a influência da GA na temperatura de gelificação é mais importante para baixos graus de hidrólise.

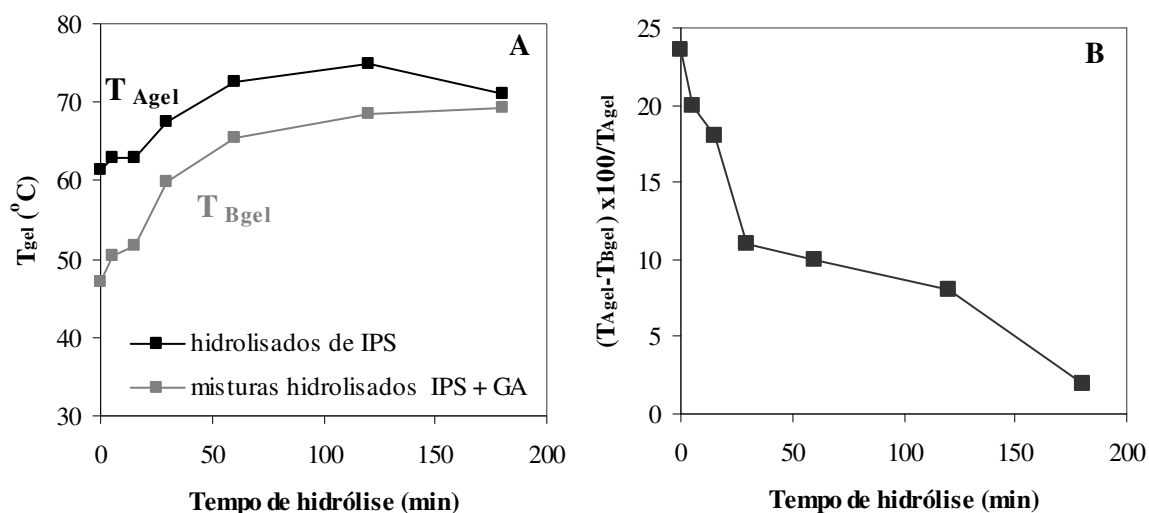
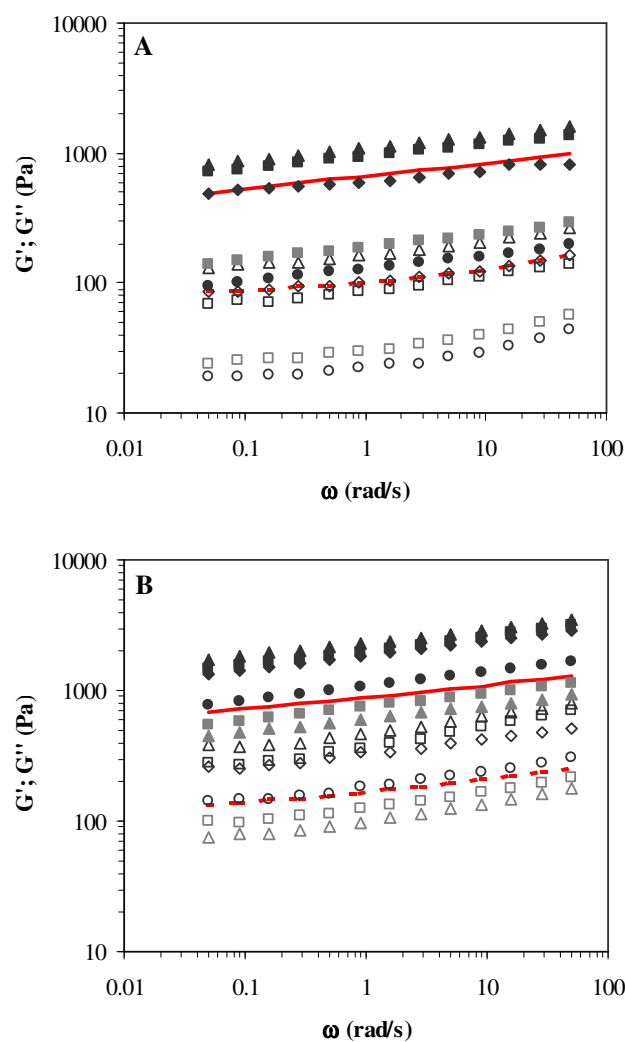


Figura 4.11- Variação da temperatura de gelificação (T_{gel}) com o tempo de hidrólise para dispersões de IPS 12 % sem e com GA a 0.3 % (A) e efeito da adição da GA na temperatura de gelificação dos sistemas em estudo

À semelhança do verificado no capítulo 3, a presença de GA levou à diminuição da temperatura de gelificação (Figura 4.11 A) embora para o maior tempo de hidrólise (maior GH) estudado se observe a aproximação dos valores das temperaturas de gelificação dos hidrolisados com e sem GA, verificando-se mais uma vez que o efeito da GA é mais pronunciado para menores GH. Para as misturas com GA, no início da experiência, o módulo de perda foi superior ao do módulo de armazenamento, principalmente para os hidrolisados de maior GH, denotando o caráter predominantemente viscoso do polissacarídeo. Contrariamente ao observado na Figura 4.8, o aumento do GH provocou um progressivo decréscimo dos módulos viscoelásticos sugerindo que o efeito da GA sobrepõe-se à existência de agregados entre as moléculas dos hidrolisados.

4.3.2.2 Comportamento viscoelástico dos géis formados

Após arrefecimento até 20 °C o efeito do tempo de hidrólise/GH e da adição de GA no comportamento viscoelástico do gel formado foi analisado realizando ensaios oscilatórios de varrimentos em frequência. A Figura 4.12 mostra os espectros mecânicos obtidos para o gel das amostras controlo e hidrolisados (Figura 4.12 A) e das misturas com GA (Figura 4.12 B).



(—; ---) controlo; (\blacktriangle , \triangle) hidrolisado A; (\blacksquare , \square) hidrolisado B; (\blacklozenge , \lozenge) hidrolisado C;
 (\bullet , \circ) hidrolisado D; (\blacktriangle , \triangle) hidrolisado E; (\blacksquare , \square) hidrolisado F

Figura 4.12 – Espectros mecânicos (G' - símbolos fechados e linha a cheio; G'' - símbolos abertos e linha a tracejado) para a amostra controlo (linhas a vermelho), hidrolisados do IPS a 12% (símbolos pretos e cinzentos) (A) e sistemas mistos IPS12%/GA0.3% (B) obtidos após varrimento em temperatura

Todos os géis analisados demonstraram caracter predominantemente elástico com G' sempre superior a G'' na gama de frequências analisada.

A Figura 4.13 mostra a variação do módulo de armazenamento e da tan delta, medidos para uma frequência de oscilação de 0.5 rad/s, em função do tempo de hidrólise para dispersões de hidrolisados de IPS.

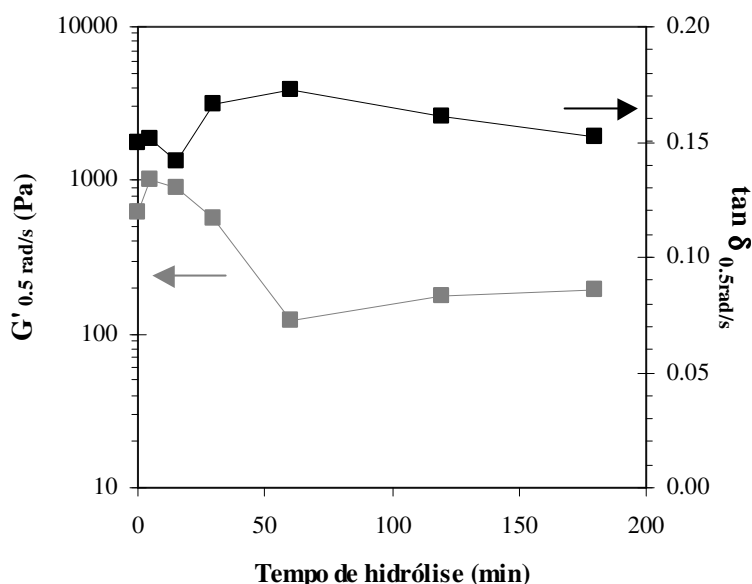


Figura 4.13- Variação do módulo de armazenamento (G') e da tangente de delta ($\tan \delta$) à frequência de oscilação de 0.5 rad/s de dispersões de hidrolisados de IPS a uma concentração de proteína de 12 %.

Para o GH mais baixo verificaram-se módulos superiores ao controlo, mas depois os módulos tendem a diminuir com o aumento do GH, apesar deste efeito se inverter nos hidrolisados E e F onde os módulos assumem valores superiores aos registados para o hidrolisado D. As proteólises com GH mais pequenos (hidrolisados A e B) resultaram num aumento significativo dos módulos G' e G'' relativamente ao controlo, note-se que G' do hidrolisado A aumentou aproximadamente 50 % e do hidrolisado B cerca de 30 %, o que denota o aumento acentuado do carácter elástico destes hidrolisados, traduzindo-se num decréscimo dos valores da $\tan \delta$.

A constante M avalia o grau de dependência de G' com a frequência de oscilação (calculada de acordo com a equação 3.7), observando-se o seu decréscimo de 0.096, no caso do IPS controlo e hidrolisados A e B, para 0.079 no hidrolisado C, sugerindo que a estrutura deste gel é mais estável e com menor tendência para a ocorrência de rearranjos.

A adição da GA provocou o aumento generalizado do valor de ambos os módulos viscoelásticos, continuando a prevalecer o caráter elástico embora o efeito seja mais pronunciado no módulo viscoso pois o aumento dos seus valores é acentuado. Por outro lado, os géis dos hidrolisados com maior GH apresentaram menor aumento do valor da constante M por efeito da adição do polissacarídeo: com a adição da GA, o valor da constante M do hidrolisado C passou de 0.079 para 0.111 enquanto que o valor de M do gel do hidrolisado E praticamente não sofreu alterações com a presença do polissacarídeo (passando apenas de 0.100 para 0.106).

4.3.2.3 Maturação dos géis a 80 °C

O efeito do grau de hidrólise na evolução de G' com o tempo foi avaliado por análise de ensaios isotérmicos a 80 °C durante 150 min (Figura 4.14). O grau de hidrólise influenciou quer a taxa de crescimento do módulo elástico quer o seu valor final.

Em concordância com os resultados obtidos nos varrimentos em temperatura, os resultados dos ensaios isotérmicos mostraram novamente o efeito positivo da proteólise moderada (hidrolisados A e B), com um aumento da rigidez e elasticidade do gel como resultado da exposição de um maior número de grupos reativos, por efeito da proteólise enzimática das proteínas de soja. Os restantes hidrolisados formaram géis menos fortes do que o controlo embora a rigidez dos géis E e F tivesse sido superior à dos géis C e D aproximando-se o seu caráter viscoelástico da amostra controlo, como se comprova pela proximidade dos valores da tangente ao ângulo de perda (Figura 4.14 II).

A diminuição da capacidade gelificante dos hidrolisados C, D, E e F comparativamente ao IPS controlo possivelmente resulta do progressivo decréscimo da massa molecular dos péptidos formados e aumento da carga na proteína, resultante do progressivo aumento do grau de hidrólise, o que aumenta as repulsões entre os péptidos, diminuindo assim a capacidade gelificante das proteínas de soja dos hidrolisados com maior GH comparativamente à amostra controlo.

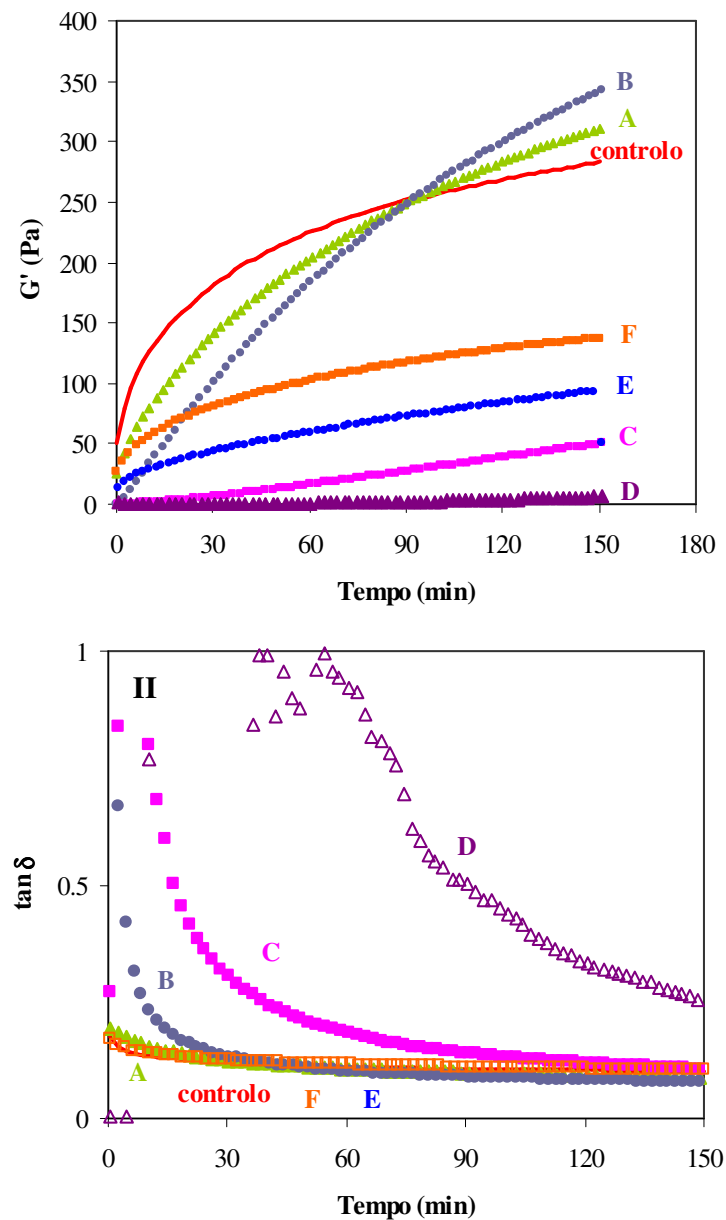


Figura 4.14 – Variação de G' (I) e da tangente ao ângulo de perda, $\tan \delta$ (II) durante as experiências de cura a 80 °C para a amostra controle (linha vermelha) e hidrolisados (símbolos pretos) do IPS (12%), a pH 7. As letras correspondem à nomenclatura do hidrolisado.

Com o objetivo de quantificar as diferenças observadas entre a maturação isotérmica de cada sistema, realizou-se uma análise cinética da curva de gelificação isotérmica a 80 °C com base na equação geral 4.4:

$$dG'/dt = k (G'_e - G'_{(t)})^n \quad (4.4)$$

onde G'_e corresponde ao módulo de armazenamento de pseudo-equilíbrio (valor de *plateau*), k a taxa de gelificação e t o tempo.

Contudo, verificou-se que um único processo cinético não conseguiu descrever satisfatoriamente a totalidade do processo de gelificação observado para o IPS e seus hidrolisados enzimáticos. Assim, assumiu-se a ocorrência de dois processos, com cinéticas de primeira ordem, mas com diferentes velocidades de ocorrência, ajustando-se a equação 4.5 aos restantes resultados experimentais obtidos.

$$G' = G'_0 + G'_1(1-e^{-k_1 t}) + G'_2(1-e^{-k_2 t}) \quad (4.5)$$

$$G'_e = (G'_0 + G'_1 + G'_2) \quad (4.6)$$

Sendo G'_0 o valor inicial de G' ($t=0$), G'_1 e G'_2 valores dos módulos correspondentes às contribuições do processo inicial de desenvolvimento da estrutura, mais rápido, e do processo mais lento de maturação, respectivamente, e k_1 e k_2 , as constantes de velocidade de cada um desses processos.

Os valores dos parâmetros cinéticos determinados por ajuste não linear da equação 4.5 e 4.6 apresentam-se na Tabela 4.1.

Tabela 4.1- Valores de parâmetros cinéticos obtidos por aplicação das equações 4.5 e 4.6 aos resultados de maturação, a 80 °C, dos géis de IPS controle e hidrolisados de IPS A (H-A), B (H-B), E (H-E) e F (H-F). Para os hidrolisados C e D a aplicação do modelo utilizado não foi bem sucedida.

Parâmetros	Amostras				
	Controle	H- A	H-B	H-E	H-F
G'_1	186.04	331.15	321.81	127.36	107.27
k_1	0.0148	0.0093	0.007	0.0051	0.0104
G'_2	64.66	37.06	201.18	13.55	25.27
k_2	0.153	0.106	0.007	0.142	0.133
G'_e	250.7	368.21	522.99	140.91	132.54

O comportamento cinético das proteínas de soja foi drasticamente alterado com o processo de hidrólise enzimática e dependente do GH. À semelhança de resultados anteriormente já discutidos, GH menores (hidrolisados A e B) promoveram o aumento de G'_e observando-se um aumento quer de G'_1 quer de G'_2 com o GH. Por outro lado, observa-se um

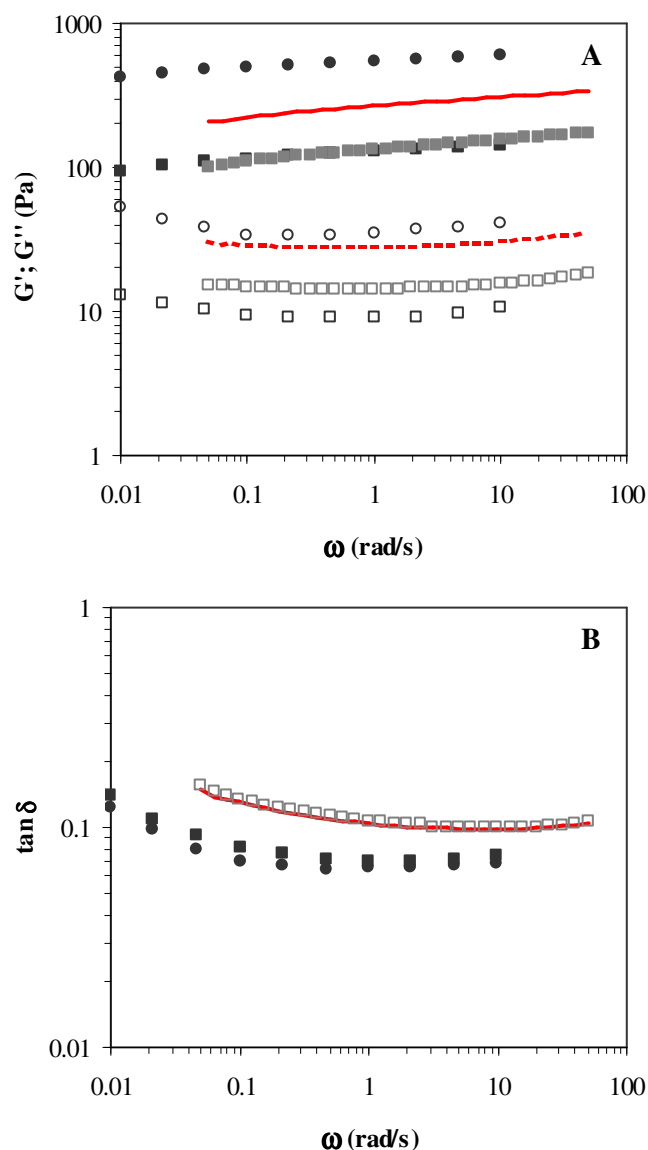
decréscimo da taxa de crescimento de G' (k_1) e da taxa de desenvolvimento da estrutura (k_2) destes hidrolisados comparativamente ao controlo. Os resultados obtidos sugerem que a diminuição do tamanho das cadeias péptidicas resulta em taxas de gelificação mais lentas o que possivelmente permitirá a formação de um maior número de junções elasticamente ativas e, conseqüentemente, a formação de géis mais elásticos.

Contudo, com a progressão da proteólise, hidrolisados E e F formam-se géis menos elásticos, com G' e inferiores aos registados para o IPS controlo.

Os hidrolisados intermédios C e D, para 30 e 60 min, respetivamente, mostraram uma cinética de gelificação mais lenta, com tendência para um período inicial de latência, iniciando-se o aumento de G' mais tarde e, ao fim de 150 min de ensaio, G' estava longe de atingir o pseudo-equilíbrio, pelo que a análise realizada para o IPS controlo e restantes hidrolisados não foi bem sucedida para os hidrolisados C e D, não sendo por isso, apresentados na Tabela 4.1 os dados cinéticos referentes a estes hidrolisados.

Analisando a Figura 4.14 II constata-se que, ao longo da experiência, os valores da $\tan \delta$ dos sistemas em estudo decrescem demonstrando o aumento do carácter elástico de todos os sistemas com o aquecimento a 80 °C. O efeito do GH traduziu-se num considerável aumento do carácter viscoso inicial, ou seja um aumento do valor da $\tan \delta$, como resultado da diminuição do tamanho das cadeias peptídicas embora o mesmo não se observe para os hidrolisados E e F para os quais o valor de $\tan \delta$ inicial diminuiu, possivelmente em consequência do efeito da existência de agregados nestas amostras.

Os espectros mecânicos de todos os sistemas estudados mostraram que G' foi sempre superior a G'' no intervalo de frequências analisadas e que ambos os módulos apresentavam pouca dependência da frequência de oscilação (Figura 4.15 A). Mais uma vez se comprovou que a hidrólise controlada (hidrolisados A e B) permitiu melhorar o carácter elástico dos sistemas como se observou pela diminuição dos valores da $\tan \delta$ (Figura 4.15 B). O aumento do GH resultou no aumento do carácter viscoso dos sistemas (aumento da $\tan \delta$) possivelmente devido ao impedimento da formação de uma rede bem organizada e estruturada com a totalidade da proteína incorporada devido à formação de agregados durante a fase da hidrólise enzimática.



(●,○) - hidrolisado B; (■,□) - hidrolisado C; (■,□) - hidrolisado F

Figura 4.15 – Espectro mecânico (G' - símbolos fechados; G'' - símbolos abertos) para IPS controle (vermelho) e hidrolisados do IPS (símbolos pretos e cinzentos), obtidos após uma cinética a 80 °C (A) e respetiva variação da tangente ao ângulo de perda, $\tan \delta$ (B).

4.3.3 Efeito da massa molecular da GA na gelificação dos hidrolisados de IPS

De forma a ser possível avaliar o efeito da massa molecular da GA na gelificação dos hidrolisados de proteína de soja selecionou-se o hidrolisado A e E e adicionou-se GA com três massas moleculares distintas: GA não submetida a hidrólise, de massa molecular 2.1 x

10^6 Da, já anteriormente utilizada, GA submetida a 1 h de hidrólise com massa molecular 3.5×10^5 Da e GA submetida a 20 h de hidrólise com massa molecular 1.5×10^5 Da (descritas no capítulo 3). Para facilitar a nomenclatura, as amostras de GA passarão a designar-se por GA0, GA1 e GA2, respetivamente.

Tendo em conta que se pretendia avaliar o efeito da massa molecular da GA, foi conveniente aumentar a quantidade de polissacarídeo adicionado à mistura pelo que, em termos práticos, foi necessário reduzir a concentração de proteína. Assim, na parte do trabalho que se descreve a seguir utilizou-se uma concentração de proteína de 10 % em vez dos 12 % anteriormente utilizados.

O efeito da adição de 0.4 % de GA a sistemas com uma concentração proteica de 10 % foi claramente dependente da massa molecular da galactomanana: Analogamente ao observado para IPS, a adição de GA de maiores massas moleculares resultou no aumento dos módulos viscoelásticos iniciais e na diminuição da temperatura de gelificação. Contudo, em termos de gel final observa-se que a GA de menor massa molecular teve um efeito positivo relativamente à amostra sem polissacarídeo enquanto que as amostras de GA de maiores massas moleculares exerceram um efeito negativo, o qual decresceu com a diminuição da massa molecular da GA (Figura 4.16).

Esta observação possivelmente reflete a intensidade da incompatibilidade entre os biopolímeros que, tal como discutido no capítulo 3, mostrou ser dependente da massa molecular do polissacarídeo e tanto mais extensa quanto maior a massa molecular do polissacarídeo. Quando a massa molecular da GA é pequena, as cadeias de polissacarídeo possivelmente conseguem interpenetrar os espaços livres existentes na rede tridimensional proteica, permitindo assim um reforço do gel, traduzido no aumento dos módulos viscoelásticos finais relativamente à amostra sem GA. Com o aumento do tamanho do polissacarídeo, aumentam os processos de segregação entre os biopolímeros, tal como observado no capítulo 3, o que implica o aumento da concentração local de cada componente, o que será, provavelmente, desfavorável pois aumentam as repulsões entre os grupos ionizáveis dos péptidos, expostos em maior número devido à proteólise das proteínas de soja.

Os resultados obtidos permitiram concluir que a intensidade dos efeitos da GA e da massa molecular foi dependente do GH do hidrolisado. Repare-se que para o hidrolisado A a

GA1 exerceu efeito negativo enquanto que para o hidrolisado E, essa mesma amostra de GA, tem um efeito positivo.

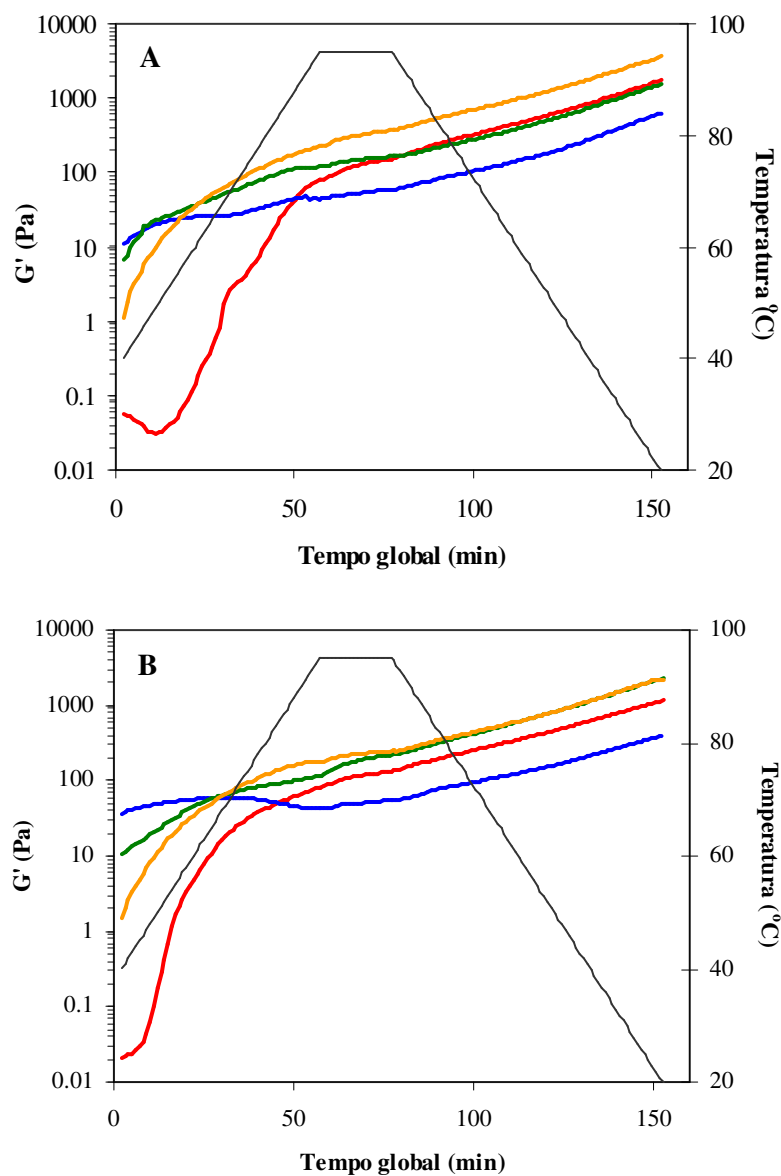


Figura 4.16 – Evolução do módulo de armazenamento com a variação da temperatura dos hidrolisados sem GA (linhas vermelhas) e dos sistemas mistos contendo hidrolisado A (A) ou hidrolisado E (B) com concentração de proteína de 10% e GA a 0.4% e massa molecular variável: GA0 (linhas azuis); GA1 (linhas verdes); GA2 (linhas laranjas)

Por outro lado, o efeito positivo da GA2 na gelificação do hidrolisado A é menos pronunciado do que no hidrolisado E.

A análise da figura 4.17 mostra que em todos os sistemas prevaleceu o caráter elástico, com G' sempre superior a G'' , independentemente da massa molecular da GA e do GH do hidrolisado.

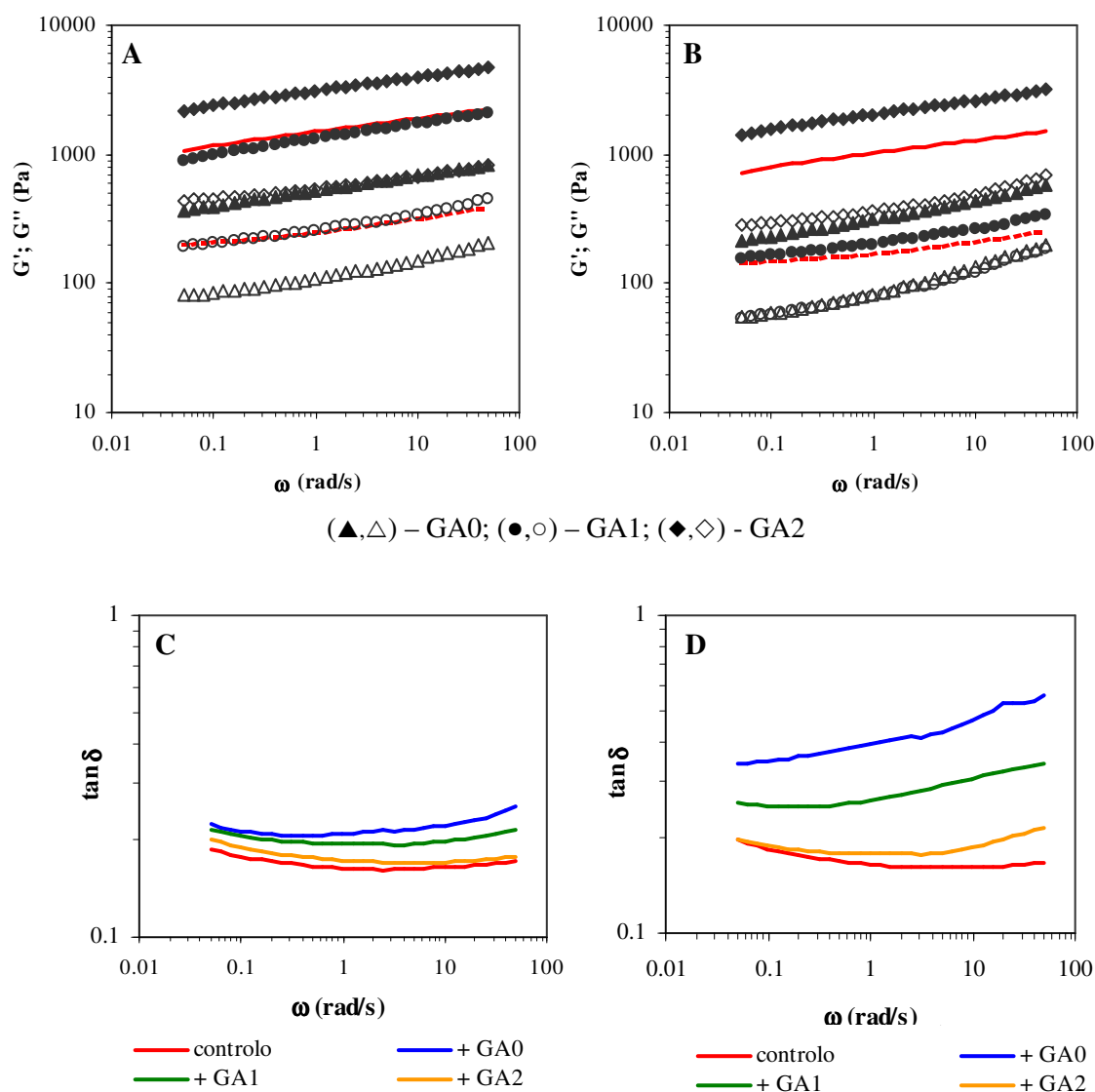


Figura 4.17 – Espetros mecânicos (A, B) de sistemas contendo apenas hidrolisados de IPS sem adição de GA (linhas vermelhas) e das misturas com GA com diferentes massas moleculares (G' – símbolos fechados; G'' – símbolos abertos). Variação da $\tan \delta$ com a frequência de oscilação para os sistemas em estudo. (A e C) – hidrolisado A; (B e D) – hidrolisado E

A dependência dos módulos viscoelásticos face à frequência de oscilação aumentou com a massa molecular e o GH. A adição de GA aumentou o caráter viscoso de todos os sistemas, como se observa pelo aumento dos valores de $\tan \delta$ relativamente às amostras controle

(Figura 4.17 C e D), mas este efeito foi mais pronunciado para a GA de maior massa molecular.

Uma vez constatado que a massa molecular influenciava determinantemente o tipo de efeito na gelificação dos hidrolisados, o passo seguinte foi avaliar a influência das concentrações da GA na capacidade gelificante dos hidrolisados A e E. Para isso, utilizou-se a GA0 e a GA2 e mantendo fixa a concentração proteica do hidrolisado variou-se a concentração do polissacarídeo. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 4.18.

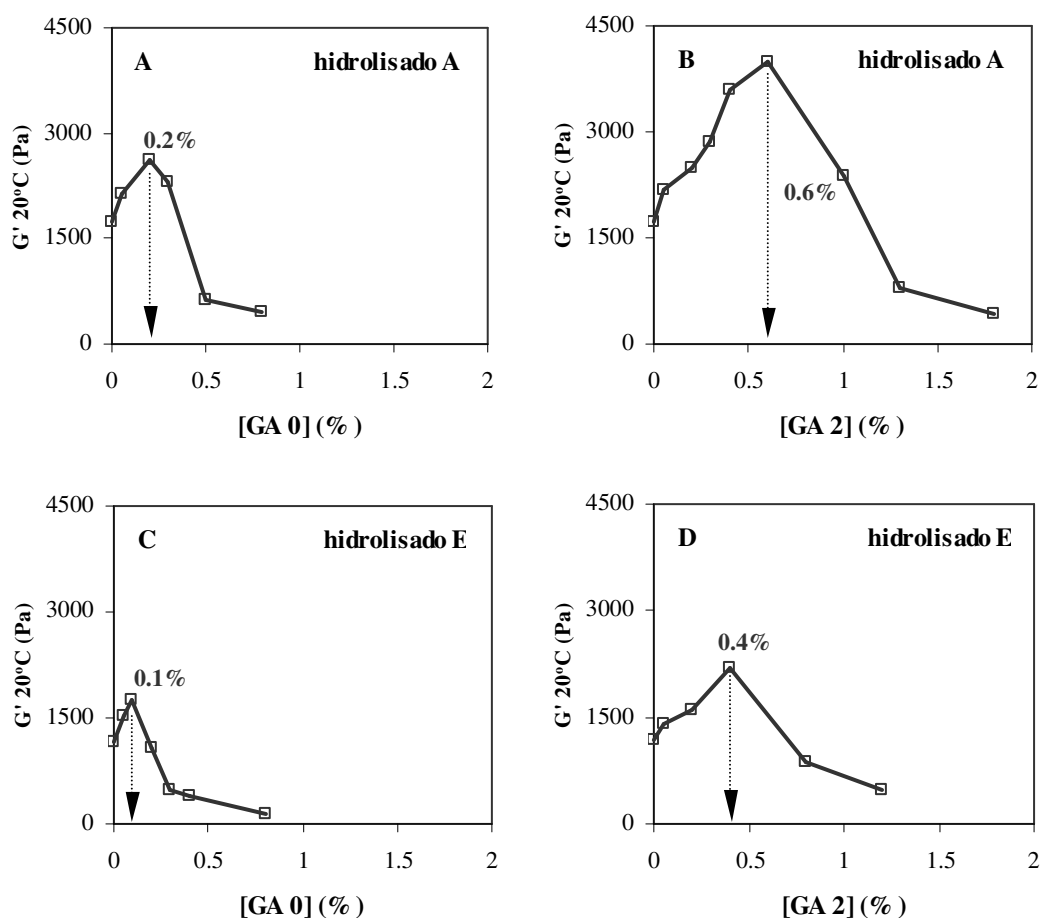


Figura 4.18 – Valores de G' dos sistemas mistos hidrolisados de IPS + GA, a 20 °C após varrimento em temperatura (40-95-20°C), em função da concentração da GA0 (A e C) e GA2 (B e D).

Os resultados obtidos mostram claramente que a concentração crítica a partir da qual a GA tem um efeito negativo na capacidade gelificante dos hidrolisados foi dependente da massa molecular da GA bem como do GH do hidrolisado. Para o hidrolisado contendo cadeias de

maior tamanho (hidrolisado A), a diminuição da massa molecular em cerca de 93 % (GA0 → GA2) aumentou três vezes a concentração crítica da GA, a qual passou de 0.2 para 0.6 %. Quando analisamos o efeito da concentração do polissacarídeo na gelificação do hidrolisado com maior GH (Hidrolisado E) constata-se que, para a mesma diminuição de massa molecular, a concentração crítica aumentou quatro vezes. Assim, o hidrolisado contendo cadeias peptídicas de menores dimensões (hidrolisado E) mostrou ser mais sensível ao efeito da concentração da GA.

Em suma, por decréscimo da massa molecular do polissacarídeo aumentou-se a compatibilidade entre os biopolímeros obtendo-se géis mais fortes e rígidos. Por outro lado, a diminuição do tamanho das cadeias peptídicas (aumento de GH) diminui a concentração crítica, pelo que se acentua a incompatibilidade entre a GA e o hidrolisado.

4.3.4 Capacidade emulsionante dos hidrolisados enzimáticos obtidos e suas misturas com goma de alfarroba

De acordo com a literatura, a especificidade enzimática e o GH determinam o efeito da proteólise na atividade emulsionante dos hidrolisados (Zhao e Hou, 2009). De um modo geral, a hidrólise limitada, devido à exposição dos grupos hidrofóbicos e ao intensificar das interações entre proteínas e lípidos, resulta na melhoria da atividade emulsionante, embora esta decresça progressivamente à medida que se formam péptidos sucessivamente mais pequenos resultantes de hidrólises mais extensas (Govindaraju e Srinivas, 2006). As diferentes características moleculares das proteínas, tais como hidrofobicidade, flexibilidade, estrutura terciária e quaternária e a composição em aminoácidos, são determinantes para as propriedades emulsionantes (Petruccelli e Añón, 1994). Os resultados encontrados na literatura sobre o efeito da hidrólise na atividade emulsionante são, por vezes, divergentes em termos de GH a partir do qual o efeito da hidrólise é negativo. Segundo o trabalho de Qi *et al.* (1997) a atividade emulsionante atingiu o seu máximo em hidrolisados de soja, obtidos com pancreatina, a um valor de GH de 15 %. Valores superiores de GH resultaram na diminuição da atividade emulsionante. Por outro lado, o índice de estabilidade da emulsão diminuiu com o aumento do GH como resultado da redução da viscosidade da fase contínua por diminuição do tamanho dos péptidos obtidos por hidrólise. Em contrapartida, Tsumura *et al.* (2005) reportaram a diminuição da

atividade emulsionante em hidrolisados de soja, obtidos por ação da papaina, a partir de um GH de 14 %.

No presente trabalho, determinaram-se, por turbidimetria, os valores do índice de atividade emulsionante (IAE) e do índice de estabilidade da emulsão (IEE) os quais são apresentados, respectivamente, nas Figuras 4.19 e 4.20.

Relativamente ao controlo, o hidrolisado com menor GH, apresentou maior atividade emulsionante. O aumento posterior do GH levou ao decréscimo do IAE dos hidrolisados embora o hidrolisado B apresente IAE significativamente superior à da amostra controlo. Os resultados obtidos provavelmente resultam de um balanço entre a maior ou menor exposição de grupos hidrofóbicos e o menor ou maior tamanho das cadeias peptídicas, resultantes dos diferentes tempos de hidrólise.

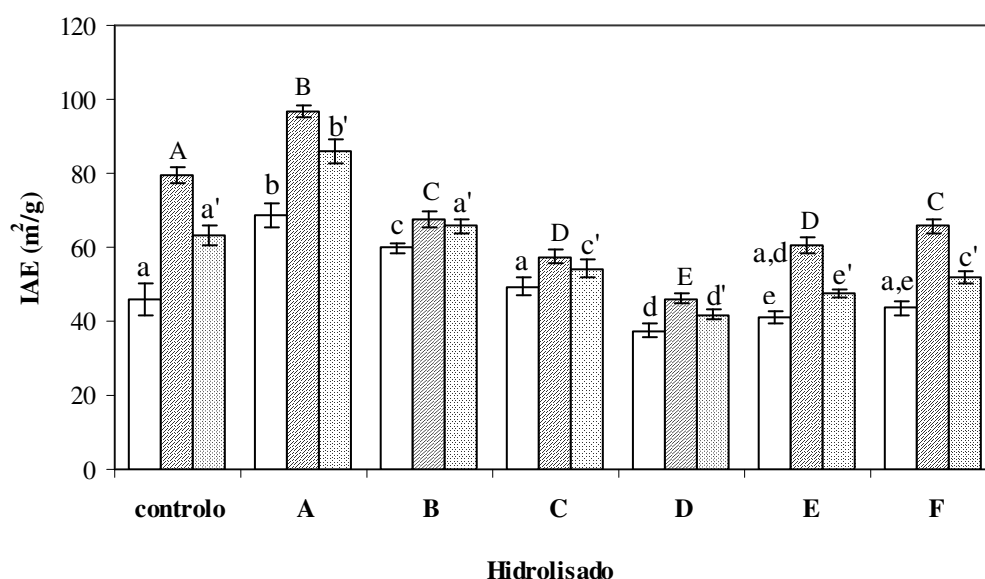


Figura 4.19- Atividade emulsionante (IAE) da amostra controlo e hidrolisados de IPS (barras brancas) e respetivas misturas com GA0 (barras preenchidas com riscas) e GA2 (barras preenchidas com pintas), a pH 7. Os resultados correspondem a valores médios e desvios padrão de três réplicas. Letras diferentes nas barras de erro indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre as amostras do mesmo tipo.

No caso dos hidrolisados A e B, o processo de proteólise que deu origem a estes hidrolisados permitiu gerar péptidos com tamanho considerável, fundamentais para a capacidade emulsionante (Zhao e Hou, 2009), melhorar o balanço entre grupos hidrofílicos

e hidrofóbicos e obter um maior número de peptídeos disponíveis na interface óleo-água melhorando assim a capacidade emulsionante relativamente ao controlo.

A atividade emulsionante não foi significativamente diferente para o controlo e hidrolisados C, E e F, embora se assuma, pelo que foi já referido, que os fatores cuja contribuição predomina para a atividade interfacial de cada uma destas amostras seja diferente.

Segundo Radha *et al.* (2007) as interações entre moléculas peptídicas originam agregados que a partir de determinada concentração permitem aprisionar moléculas de óleo na rede tridimensional melhorando assim as propriedades emulsionantes. Esta poderá ser uma possível razão para a tendência do aumento dos valores de IAE dos hidrolisados E e F , apesar da maior redução do tamanho dos peptídeos presentes nestas amostras.

O GH promoveu o decréscimo dos valores do IEE (Figura 4.20) em concordância com o já descrito por outros investigadores Qi *et al.* (1997).

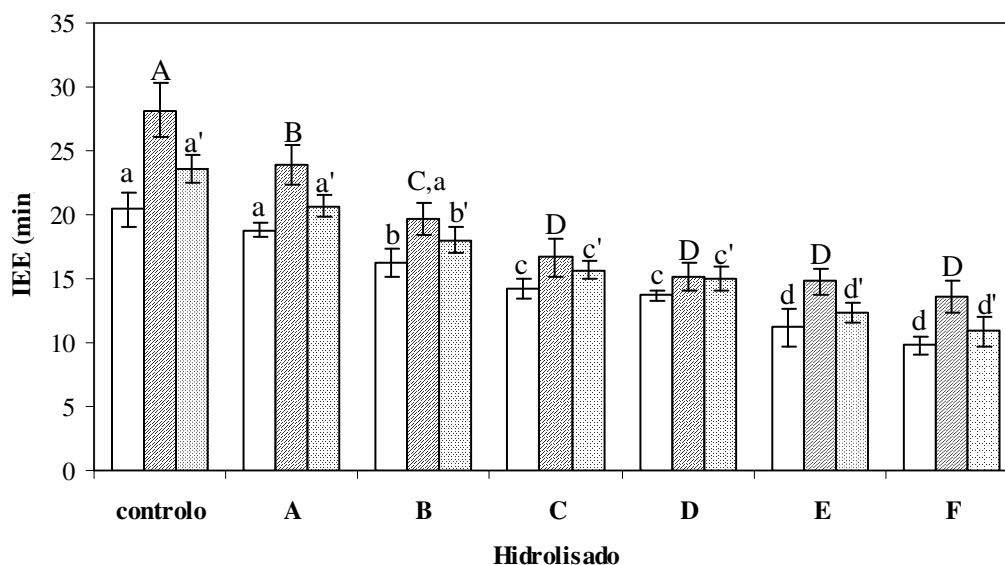


Figura 4.20- Índice de estabilidade da emulsão (IEE) da amostra controlo e hidrolisados de IPS (barras brancas) e respetivas misturas com GA0 (barras preenchidas com riscas) e misturas com GA2 (barras preenchidas com pontos), a pH 7. Os resultados correspondem a valores médios e desvios padrão de três réplicas. Letras diferentes nas barras de erro indicam diferenças significativas ($p < 0.05$).

Proteínas e polissacarídeos são normalmente combinados para melhorar a estabilidade dos sistemas dispersos. A maioria dos polissacarídeos, sendo hidrofílicos, não apresentam grande tendência para adsorver na interface ar-água, mas conseguem aumentar

acentuadamente a estabilidade de emulsões e espumas por atuarem como agentes espessantes e/ou gelificantes.

Neste sentido, o passo seguinte do presente trabalho foi avaliar o efeito da adição da GA, um polissacarídeo neutro, no IAE e no IEE. Os resultados obtidos mostraram que a adição da GA teve um efeito positivo no IAE aumentando significativamente os seus valores relativamente às amostras sem polissacarídeo (Figura 4.19). Contudo, a intensidade deste efeito foi dependente do GH tendo sido mais pronunciado para a amostra controlo e hidrolisados A, E e F, cujo aumento foi de 42, 29, 33 e 34 %, respetivamente, comparativamente com as amostras sem GA (Figura 4.21 A). Estas observações devem-se provavelmente à incompatibilidade mais acentuada entre os biopolímeros nestes sistemas resultante do tamanho da proteína, no caso do controlo e hidrolisado A, e da existência de agregados nos hidrolisados E e F. Estes resultados permitem concluir que a adição da GA contribuiu favoravelmente para a diminuição do efeito negativo das hidrólises mais extensas na atividade emulsionante.

Na Figura 4.21 A mostra-se a variação do IAE com o tempo de hidrólise para as dispersões contendo os hidrolisados de proteína de soja e GA0 e GA2 e na Figura 4.21 B a variação relativa do aumento do IAE devido à variação da massa molecular de GA. Os resultados mostraram que a massa molecular do polissacarídeo influenciou a intensidade do efeito anteriormente descrito: A adição da GA2 promoveu o aumento do IAE relativamente às amostras sem polissacarídeo mas este aumento foi inferior ao observado por adição de GA0, tal como se constata pela análise da Figura 4.21 A. Por outro lado, o efeito da redução da massa molecular da GA foi mais sentida nos hidrolisados com maior GH (Figura 4.21 B).

Em termos de IEE, os resultados mostraram que a adição da GA aumentou o IEE (Figura 4.20), o qual foi dependente do GH. O efeito positivo observado resultou possivelmente da incompatibilidade termodinâmica entre os biopolímeros o que intensificou a adsorção da proteína e diminuiu os requisitos necessários para a adsorção de multicamadas (Tolstoguzov, 1991).

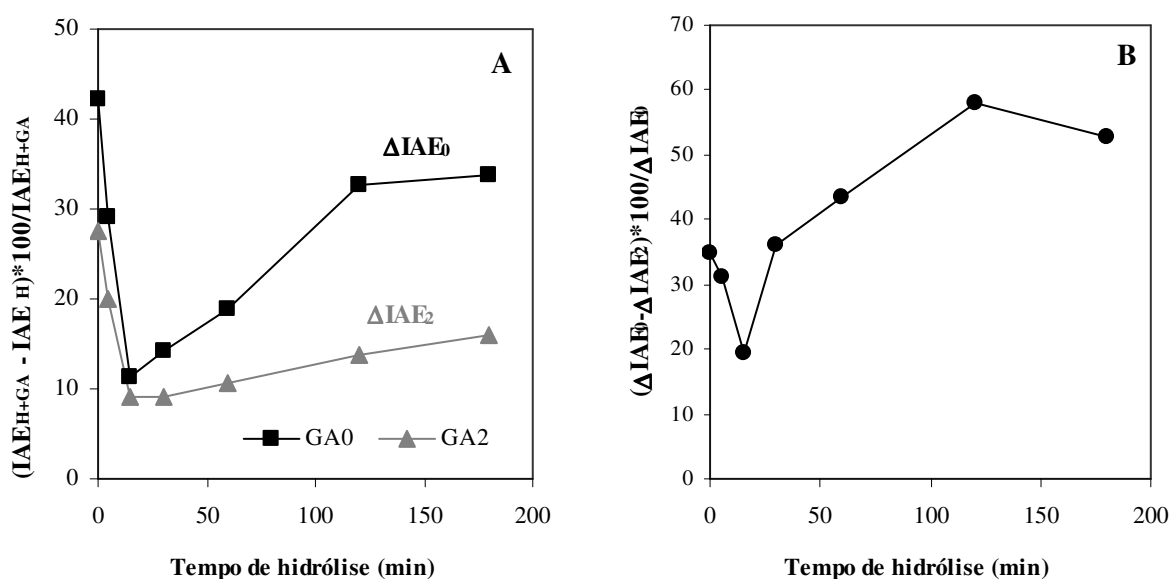


Figura 4.21- Efeito da adição da GA com diferentes massas moleculares, GA0 e GA2, no IAE em função do tempo de hidrólise (A) e variação relativa do IAE devido à variação da massa molecular da GA (B).

Na Figura 4.22 representa-se o efeito da adição de GA e da sua massa molecular no aumento do IEE, dos sistemas em estudo, em função do tempo de hidrólise.

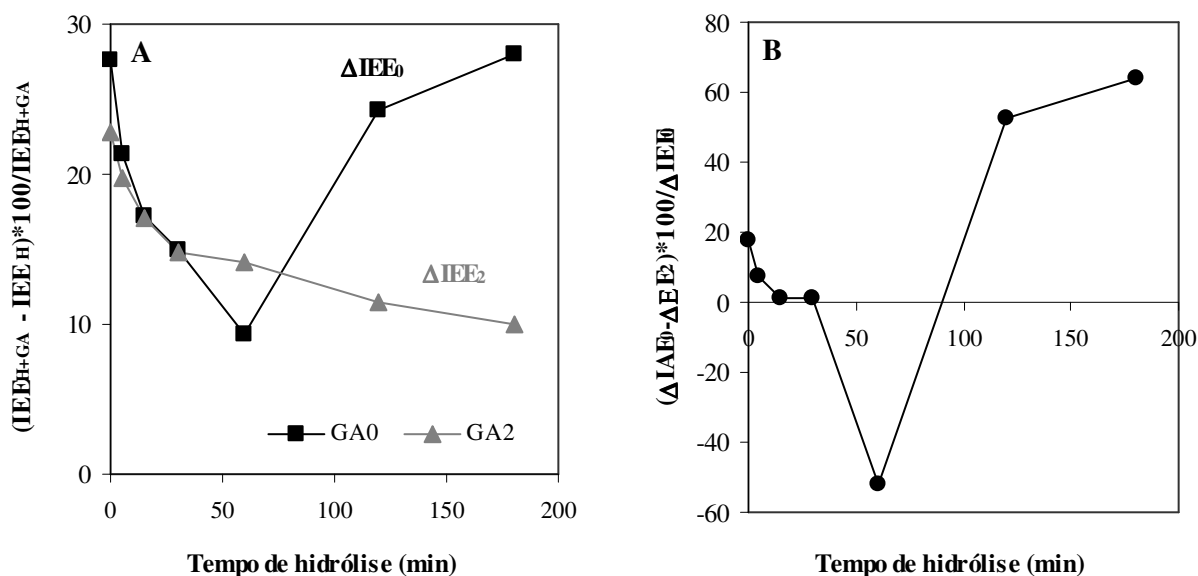


Figura 4.22- Efeito da adição da GA com diferentes massas moleculares, GA0 e GA2, no IEE em função do tempo de hidrólise (A) e variação relativa do IEE devido à variação da massa molecular da GA (B)

O efeito do GH no IEE das misturas hidrolisados/GA foi dependente da massa molecular da GA adicionada, sendo menor para sistemas contendo a amostra de GA de menor massa molecular. Para as misturas contendo a GA de maior massa molecular, o aumento do GH até cerca de 15.7 % (hidrolisado D, 60 min de hidrólise) desencadeou o decréscimo do efeito positivo da GA no IEE: a adição da GA0 resultou num aumento do IEE em 21 % no caso do hidrolisado A enquanto que para o hidrolisado D o aumento foi apenas de 10 %. Esta tendência foi invertida para os dois hidrolisados de maior GH (E e F). A adição da GA de menor massa molecular (GA2), embora tenha promovido um aumento do IEE comparativamente ao controlo, desencadeou um decréscimo deste efeito, principalmente para hidrolisados com maior GH (Figura 4.22 A).

Pode-se assim inferir que a estabilidade das emulsões foi favorecida pela adição da GA sendo este efeito mais intenso para as amostras de polissacarídeo de maior massa molecular devido provavelmente à sua maior viscosidade, o que aumenta o tempo de vida das emulsões evitando os processos de floculação e coalescência.

4.4 Considerações finais

A obtenção de hidrolisados de proteína de soja com diferentes GH permitiu diversificar e ampliar as propriedades funcionais nomeadamente a capacidade gelificante e emulsionante.

De um modo geral, os resultados obtidos mostraram que para GH pequenos, os péptidos libertados durante a hidrólise catalisada pela bromelina, retiveram capacidade de gelificação nas condições experimentais em que foi realizado o estudo. Contudo, a hidrólise mais extensa, para valores de GH iguais ou superiores a 15 % reduziu drasticamente a capacidade de gelificação das proteínas do isolado de soja provavelmente devido ao decréscimo da quantidade de proteína que participou na formação da estrutura do gel e, possivelmente devido à interação entre os péptidos libertados durante a hidrólise e as moléculas proteicas que, por associação, estabilizam a estrutura da proteína e/ou a impedem de estabelecer interações, hidrofóbicas e/ou covalentes, efetivas para a criação da estrutura elástica tridimensional que caracteriza um gel.

A adição da GA apresentou um efeito positivo cuja intensidade foi dependente do GH. A concentração crítica limite de compatibilidade entre os hidrolisados de proteína de soja e a

GA foi dependente quer do GH quer da massa molecular do polissacarídeo: aumentando com o decréscimo do GH e da massa molecular da GA.

As propriedades emulsionantes foram também influenciadas pela extensão da hidrólise das proteínas de soja constatando-se que o efeito negativo do aumento do GH foi minimizado pela adição da GA sendo a massa molecular do polissacarídeo determinante da intensidade do efeito observado.

Assim, a modulação das propriedades gelificantes e emulsionantes recorrendo à hidrólise enzimática e às misturas dos hidrolisados obtidos com a GA, associado às vantagens nutricionais descritas na introdução deste capítulo, potencializa a aplicação dos hidrolisados de proteínas de soja.

Do ponto de vista prático estes resultados mostram que uma gama mais variada de propriedades funcionais pode ser obtida alterando o GH, massa molecular e concentração do polissacarídeo inserido num sistema misto IPS/GA, permitindo assim obter diferentes propriedades funcionais com potencial aplicação em diferentes áreas.

Referências Bibliográficas

- Aaslyng, M.D., Elmore, J.S. e Mottram, D.S. (1998). Comparison of the aroma characteristics of acid-hydrolyzed and enzyme-hydrolyzed vegetable proteins produced from soy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 5225-5231.
- Adler-Nissen, J. (1976). Enzymatic Hydrolysis of Proteins for Increased Solubility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24: 1090-10-93.
- Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27: 1256-1262.
- Adler-Nissen, J. (1984). Control of proteolytic reaction of the level of bitterness in protein hydrolysis process. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 34B: 215-222.
- Adler-Nissen, J. (1986). Enzymatic hydrolysis of food proteins. Elsevier Applied Science Publishers, Ltd. London. P.426.
- Alvarez, P.A, Ramaswamy, H.S. e Ismail, AA (2008). High pressure gelation of soy proteins: Effect of concentration, pH and additives. *Journal of Food Engineering*, 88: 331-340.
- Boza, J.J., Moennoz, D., Vuichoud, J., Jarret, A.R., Gaudard-de-Weck, D. e Ballèvre, O. (2000). Protein hydrolysate vs free amino acid-based diets on the nutritional recovery of the starved rat. *European Journal of Nutritional*, 39 : 237-243.
- Chen, L., Chen, J., Ren, J. e Zhao, M. (2011). Effects of ultrasound pretreatment on the enzymatic hydrolysis of soy protein isolates and on the emulsifying properties of hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 2600-2609.
- Chen, L., Chen, J., Ren, J. e Zhao, M. (2011). Modifications of soy protein isolates using combined extrusion pretreatment and controlled enzymatic hydrolysis for improved emulsifying properties. *Food Hydrocolloids*, 25: 887-897.
- Cho, M.J., Unklebay, N., Hsieh, F.H e Clarke, A.D. (2004). Hydrophobicity of bitter peptides from soy protein hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 5895-5901.
- Clemente, A. (2000). Enzymatic protein hydrolysate in human nutrition. *Trends in Food Science and Technology*, 11: 254-262.
- Donald, P., Miller, E. e Schirmer, B. (1994). Repletion of nutritional parameters in surgical patients receiving peptide versus amino acid elemental feedings. *Nutricional Research*, 14:3-12.
- Frokjaer, S. (1994). Use of hydrolysate for protein supplementation. *Food Technology*, 48: 86-88.
- Fuke, Y., Sekiguchi, M. e Matsuoka, H. (1985). Nature of stem bromelain treatments on the aggregation and gelation of soybean proteins. *Journal of Food Science*, 50: 1283-1288.

Govindaraju, K. e Srinivas, H. (2006). Studies on the effects of enzymatic hydrolysis on functional and physico-chemical properties of arachin. *LWT- Food Science and Technology*, 39: 54-62.

Govindaraju, K. e Srinivas, H. (2007). Controlled enzymatic hydrolysis of glycinin: susceptibility of acidic and basic subunits to proteolytic enzymes. *LWT- Food Science and Technology*, 40: 1056-1065.

Hayashi, R., Kawamura, Y. e Kunugi, S. (1987). Introduction of high-pressure to food processing: preferential proteolysis of β -Lactoglobulin in milk whey. *Journal of Food Science*, 52: 1107-1108.

Hrcková, M., Rusnáková, M. e Zemanovic, J. (2002). Enzymatic hydrolysis of defatted soy flour by three different proteases and their effect on the functional properties of resulting protein hydrolysates. *Czech Journal of Food Sciences*, 20: 7-14.

Inouye, K., Nagai, K. e Takita, T. (2002). Coagulation of soy protein isolates induced by subtilisin Carlsberg. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 1237-1242.

Inouye, K., Nakano, K., Asaoka, K. e Yasukawa, K. (2009). Effects of thermal treatment on the coagulation of soy proteins induced by Subtilisin Carlsberg. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 717-723.

Jambrak, A.R., Lelas, V., Mason, T.J., Kresić, G. e Badanjak, M. (2009). Physical properties of ultrasound treated soy proteins. *Journal of Food Engineering*, 93: 386-393.

Jia, J., Ma, H., Zhao, W., Wang, Z., Tian, W., Luo, L. e He, R. (2010). The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein. *Food Chemistry*, 119: 336-342.

Karki, B., Lamsal, B.P., Grewell, D., Pometto, A.L., Leeuwen, J., Khanal, S.K. e Jung, S. (2009). Functional properties of soy protein isolates produced from ultrasonicated defatted soy flakes. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86: 1021-1028.

Khare, S.K., Jha, K. e Ghandi, A.P. (1994). Preparation of soya bean meal protein hydrolysate by agarose-entrapped *Bacillus subtilis* cells. *Food Chemistry*, 50: 121-123.

Kim, C.H., Kim, M.R. e Lee, C.H. (1992). Effect of type of enzyme on the bitterness of partial hydrolysates of soybean protein. *Food Biotechnology*, 1: 79-84.

Kuipers, B.J.H., Alting, A.C. e Gruppen, H. (2007). Comparison of the aggregation behavior of soy and bovine whey protein hydrolysates. *Biotechnology Advances*, 25: 606-610.

Kumar, R., Mishra, S. e Varma, I.K. (2004). Enzymatically modified soy protein. Part I. Thermal behaviour. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 75: 727- 738.

Lamsal, B.P., Jung, S. e Johnson, L.A. (2006). Rheological properties of soy protein hydrolysates obtained from limited enzymatic hydrolysis. *LWT- Food Science and Technology*, 40: 1215-1223.

Lee, J.-Y., Lee, H.D. e Lee, C.-H. (2001). Characterization of hydrolysates produced by mild-acid treatment and enzymatic hydrolysis of defatted soybean flour. *Food Research*

International, 34: 217-222.

Lv, Y., Guo, S. e Yang, B. (2009). Aggregation of hydrophobic soybean protein hydrolysates: Changes in molecular weight distribution during storage. *LWT – Food Science and Technology*, 42: 914-917.

Mahmoud, M.I. (1994). Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. *Food Technology*, 48: 89-95.

Martínez, K.D., Sánchez, C.C., Patino, J.M. e Pilosof, A.M.R. (2009). Interfacial and foaming properties of soy protein and their hydrolysates. *Food Hydrocolloids*, 23: 2149-2157.

Matoba, T. e Hata, H. (1972). Relationship between bitterness of peptides and their chemical structures. *Agricultural and Biological Chemistry*, 36: 1423-1431.

Meisel, H. e Schlimme, E. (1990). Milk proteins: precursors of bioactive peptides. *Trends in Food Science and Technology*, 1: 41-43.

Miñones Conde, J.M. e Patino, J.M.R. (2006). The effect of enzymatic treatment of a sunflower protein isolate on the rate of adsorption at the air-water interface. *Journal of Engineering*, 78: 1001-1009.

Nagai, K e Inouye, K. (2004). Insights into the reaction mechanism of the coagulation of soy protein isolates induced by subtilisin Carlsberg. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 4921-4927.

Netto, F.M. (1992). Produção e caracterização de hidrolisado pancreático de isolado proteico de soja para nutrição clínica. Tese de Doutoramemento em Ciências dos Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

Ney, K.H. (1979). Bitterness of peptides: amino acid composition and chain length. Em *Food Taste Chemistry*. p. 149-173. Washington, D.C; American Chemical Society.

Ortiz, S.E.M. e Añón, M.C. (2000). Analysis of products, mechanisms of reaction and some functional properties of soy protein hydrolysates. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77: 1293-1301.

Ortiz, S.E.M. e Añón, M.C. (2001). Enzymatic hydrolysis of soy protein isolates. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 66: 489-499.

Ortiz, S.E.M. e Wagner, J.R. (2002). Hydrolysates of native and modified soy protein isolates: structural characteristics, solubility and foaming properties. *Food Research International*, 35: 511-518.

Panyam, D. e Kilara, A (2003). Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. *Trends Food Science & Technology*, 7: 120-125.

Peñas, E e Préstamo, G. (2002). Digestibility of soybean whey proteins under high pressure. *Symposium of Emerging Technologies for the Food Industry*. Madrid (Espanha). P 1.01

Peñas, E.P., Préstamo, G. e Gomez, R. (2004). High pressure and enzymatic hydrolysis of soybean whey proteins. *Food Chemistry*, 85: 641-648.

Peñas, E.P., Préstamo, G., Polo, F. e Gomez, R. (2006). Enzymatic proteolysis, under high pressure of soybean whey: Analysis of peptides and the allergen Gly m 1 in the hydrolysates. *Food Chemistry*, 99: 569-573.

Petrucelli, S. e Añón, M.C. (1994). Relationship between the method of obtention and structural and functional properties of soy protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42: 2170-2176.

Puppo, C., Chapleau, N., Speroni, F., de Lamballerie-Anton, M., Michel, F., Añón, C. e Anton, M. (2004). Physicochemical modifications of high-pressure-treated soybean protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 1564-1571.

Qi, M., Hettiarachchy, N.S. e Kalapathy, U. (1997). Solubility and emulsifying properties of soy protein isolates modified by pancreatin. *Journal of Food Science*, 62: 1110-1115.

Radha, C., Kumar, P.R. e Prakash, V. (2008). Enzymatic modification as a tool to improve the functional properties of heat-processed soy flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88: 336-343.

Ryan, M., McEvoy, E., Duignan, S., Crowley, C., Fenelon, M., O'Callaghan, D.M. e FitzGerald, M. (2008). Thermal stability of soy protein isolate and hydrolysate ingredients. *Food Chemistry*, 108: 503-510.

Salado, G.A. (1997). Resposta nutricional de pacientes hospitalizados tratados com dieta formulada de hidrolisado proteico de soja. Tese de Doutorado em Ciências da Nutrição. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

Schlothauer, R., Schollum, L.M., Singh, AM. e Reid, JR. (2005). Biactive whey protein hydrolysates. Patente 6, 919, 314.

Spellman, D., McEvoy, E., O'Cuinn, G. e FitzGerald, R.J. (2003). Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparasion of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *International Dairy Journal*, 13: 447-453.

Stapelfeldt, H., Petersen, P.H., Kristiansen, K. R., Qvist, K.B. e Skibsted, L.H. (1996). Effect of high hydrostatic pressure on enzymic hydrolysis of β -Lactoglobulin B by trypsin, thermolysin and pepsin. *Journal of Dairy Research*, 63: 111-118.

Tang, C-H.e Ma, C-Y. (2009). Effect of high pressure treatment on aggregation and structural properties of soy protein isolate. *LWT-Food Science and Technology*, 42: 606-611.

Tolstoguzov, V.B. (1991). Functinal properties of food proteins and role of protein polysaccharide interaction (Review). *Food Hydrocolloids*, 4, 429-468.

Tsumura, K., Saito, T., Kugimiya, W. e Inouye, K. (2004). Selective proteolysis of the glycinin and β -conglycinin fractions in a soy protein isolate by pepsin and papain with controlled pH and temperature. *Journal of Food Science*, 69: 363-367.

Tsumura, K., Saito, T., Tsuge, K., Ashida, H., Kugimiya, W. e Inouye, K. (2005). Functinal properties of soy protein hydrolysates obtained by selective proteolysis. *LWT- Food Science and Technology*, 38: 255-261.

Wang, X-S., Tang, C-H., Li, B-S., Yang, X-Q., Li, L. e Ma, C-Y. (2008). Effects of high-pressure treatment on some physicochemical and functional properties of soy protein isolates. *Food Hydrocolloids*, 22: 560-567.

Zhang, J-B., Wu, N-N., Yang, X-Q., He, X-T. e Wang, L-J. (2012). Improvement of emulsifying properties of Maillard reaction products from β -conglycinin and dextran using controlled enzymatic hydrolysis. *Food Hydrocolloids*, 28: 301-312.

Zhao, X. e Hou, Y. (2009). Limited hydrolysis of soybean protein concentrate and isolate with two proteases and the impact on emulsifying activity index of hydrolysates. *African Journal of Biotechnology*, 8: 3314-3319.

Zhong, F., Wang, Z., Xu, S-Y e Shoemaker, C. (2007). The evaluation of proteases as coagulants for soy protein dispersions. *Food Chemistry*, 100: 1371-1376.

Ziegler, M.M.F., Nitenberg, J.G., Coudray-Lucas, J.C., Lasser, M.P. e Giboudeau, F.J. (1998). Pharmacokinetic assessment of an oligopeptide-based enteral formula in abdominal surgery patients. *American Journal of Clinical Nutritional*, 67: 124-128.

CAPÍTULO 5

Efeito do processamento por alta pressão
hidrostática nas propriedades estruturais e
funcionais de isolados de proteína de soja e suas
misturas com galactomananas

A utilização de proteínas de soja como um ingrediente tecnológico funcional depende primariamente das propriedades físico-químicas que governam a estrutura e os atributos conformacionais da proteína. No caso dos alimentos, os sistemas são multicomponentes, sendo que proteínas e polissacarídeos contribuem conjuntamente para a sua estrutura, textura e estabilidade, através das suas propriedades espessantes, gelificantes ou de superfície. Torna-se, assim, importante compreender possíveis alterações estruturais e funcionais destes componentes e as suas interações quando submetidos a processos ainda pouco explorados, como os de alta pressão.

Neste sentido, o objetivo desta parte do trabalho foi avaliar o efeito de diferentes condições de processamento por alta pressão (AP) nas propriedades estruturais e funcionais de isolados de proteína de soja, comercial e laboratorial, a pH neutro e comparar o efeito deste processamento na mistura isolado de proteína de soja com goma de alfarroba.

5.1 Introdução

A tecnologia de AP promove a eliminação de microrganismos e inativa enzimas sem expor o alimento a altas temperaturas, revelando-se uma tecnologia viável, segura e cada vez mais utilizada em todo o mundo para prolongar o tempo de vida de prateleira dos alimentos (Hoover *et al.*, 1989; Knorr, 1993; Smelt, 1998), sem afetar significativamente o seu conteúdo em vitaminas, sabor, cor e textura (Hoover *et al.*, 1989; Mertens e Knorr, 1992; Farkas e Hoover, 2000). O tratamento por AP pode também alterar as propriedades funcionais de macromoléculas alimentares, incluindo proteínas e polissacarídeos.

5.1.1 Efeito da alta pressão nas propriedades funcionais de proteínas

O processamento por AP para modificar a funcionalidade das proteínas, nomeadamente as proteínas de soja, foi estudado por vários investigadores (Messens *et al.*, 1997; Galazka *et al.*, 2000a,b; Puppo *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2008; Speroni *et al.*, 2009; Keerati-U-Rai e Corredig, 2009; Tang e Ma, 2009; Speroni *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010; Añón *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012). Segundo estes autores, a AP pode afetar a conformação das proteínas levando à sua desnaturação, agregação ou gelificação, dependendo do sistema proteico (tipo de proteína, concentração, pH, força iónica), pressão

aplicada, temperatura e duração do tratamento. Os efeitos da AP sobre as proteínas estão relacionados com a ruptura das interações não covalentes na estrutura das moléculas de proteína e a subsequente formação de novas interações intra ou intermoleculares. Assim, as estruturas terciárias e quaternárias das proteínas podem ser modificadas com pressões superiores a 200 MPa. As proteínas oligoméricas podem ser dissociadas nas suas subunidades aplicando pressões moderadas (< 150 MPa) (Messens *et al.*, 1997).

Acredita-se que as ligações de hidrogénio sejam pouco sensíveis aos tratamentos por alta pressão, os quais afetarão mais aquelas interações cuja formação se acompanha por alterações de volume mais significativas, nomeadamente interações hidrofóbicas e eletrostáticas (Ledward, 2000; Galazka *et al.*, 2000b).

São vários os trabalhos reportados na literatura que focam o estudo do efeito da AP nas propriedades funcionais de diferentes proteínas. Contudo, tendo em conta o objetivo deste trabalho, de seguida apresenta-se uma revisão bibliográfica mais detalhada do efeito da AP nas propriedades funcionais das proteínas de soja.

O efeito da AP nas propriedades emulsionantes mostrou ser dependente do valor de pressão aplicado e tempo de processamento (Molina *et al.*, 2001; Puppo *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2011) constatando-se que valores mais baixos de pressão (200-300 MPa) resultaram no aumento do índice de atividade emulsionante (IAE) e o progressivo aumento da pressão aplicada promoveu um decréscimo gradual da IAE, ainda que os valores sejam superiores aos IPS controlo (Li *et al.*, 2011). Contudo, algumas discrepâncias, no valor de pressão correspondente ao IAE máximo, são encontradas na bibliografia. Puppo *et al.* (2005) obteve um valor máximo de IAE para 200-400 MPa enquanto Li *et al.* (2011) para um valor de 300 MPa. Por outro lado, o aumento dos valores de pressão aplicados às dispersões de IPS resulta no decréscimo gradual mas significativo do índice de estabilidade da emulsão (IEE) (Li *et al.*, 2011), como resultado da diminuição de flexibilidade molecular das proteínas devido à ocorrência de agregação.

De acordo com Tang *et al.* (2011) o mecanismo do processo de emulsificação inclui, pelo menos, três passos: a adsorção da proteína na interface óleo/água, seguida de alterações na conformação terciária e quaternária e, por fim, a formação de um filme estável viscoelástico que estabiliza as partículas de gordura no meio aquoso. O primeiro passo é

influenciado pelo balanço hidrofobicidade/hidrofilicidade (ou solubilidade proteica) e altamente dependente da flexibilidade da estrutura quaternária (Tang *et al.*, 2011).

Molina *et al.* (2001) estudaram a influência do tratamento por AP (200-600 MPa) no IAE e no IEE das frações 7S, 11S e dos IPS, a valores de pH de 6.5 e 7.5, na gama de concentrações 0.25-0.75 %. A fração 7S apresentou o valor máximo de IAE e de hidrofobicidade superficial após tratamento a 400 MPa, enquanto que a fração 11S atingiu o valor máximo destes parâmetros após tratamento a 200 MPa. O IPS exibiu o valor máximo de IAE após tratamento a 400 MPa, embora a hidrofobicidade superficial tenha apresentado valores baixos e pouco afetados pelo valor de AP aplicado. Este facto foi explicado sugerindo que a 400 MPa a fração 7S do IPS dissocia-se parcial ou totalmente nos seus monómeros, aumentando a atividade emulsionante mas, simultaneamente, o desdobramento dos polipéptidos da fração 11S conduz à agregação, afetando negativamente a hidrofobicidade superficial do IPS. Os valores de IEE das amostras de IPS e das frações 7S e 11S foram superiores para os valores de concentrações mais pequenos. Para o mesmo valor de pH e concentração, o IEE diminuiu com o aumento da pressão aplicada, exceto para a fração 7S a pH 7.5 à concentração de 0.75 %.

Em investigações seguintes, Molina *et al.* (2002) estudaram as propriedades de textura e capacidade de retenção de água de géis formados por AP (300-700 MPa por 15 min.). A 20 % de concentração, IPS e as frações de globulinas 7S e 11S, produziram géis autossustentáveis. Os géis induzidos por AP apresentaram valores menores de adesividade e rigidez quando comparados com os géis formados por aquecimento (95 °C por 15 min ou 30 min). O tratamento por AP melhorou a capacidade de retenção de água dos géis formados pela globulina 7S. Os resultados de DSC e eletroforese em gel de poliacrilamida evidenciaram a desnaturação e agregação das proteínas durante a aplicação da AP e formação do gel, sendo intensificadas com o aumento do valor de pressão aplicado.

O efeito do processamento combinado entre AP (300-700 MPa) e tratamento térmico (90 °C por 15 min) na textura de géis de IPS e das frações 7S e 11S a uma concentração de 12 % a pH neutro foi estudado por Molina e Ledward (2003). Quando o tratamento térmico foi realizado antes do tratamento por AP, apenas a fração 11S formou gel autossustentável. No entanto, quando o tratamento por AP foi realizado previamente ao tratamento térmico, todos os sistemas em estudo formaram géis autossustentáveis. As análises de textura e de

capacidade de retenção de água dos géis formados comprovaram que a combinação do tratamento térmico e AP oferece a possibilidade de desenvolver novos produtos com novas texturas.

A aplicação de AP (200-600 MPa) para promover alterações físico-químicas em IPS foi avaliado por Puppo *et al.* (2004), Wang *et al.* (2008) e Li *et al.* (2011). Os primeiros autores, estudaram dois valores de pH, 3 e 8, sendo o grau de agregação das proteínas de soja maior a pH ácido, o que se refletiu no efeito da alta pressão nas proteínas dos dois isolados estudados. A pH 8, o IPS é constituído por β -conglucina e glicina ligeiramente agregadas mas com elevada solubilidade. Com o tratamento a pressões superiores a 200 MPa observou-se o aumento da hidrofobicidade, redução do conteúdo de grupos sulfidrilo livres, desnaturação parcial das globulinas 7S e 11S e posterior agregação, predominantemente, da fração 11S, observações explicadas com base na ocorrência de desnaturação parcial provocada pelo processamento a AP. Por outro lado, a pH 3, o IPS é constituído por proteínas parcialmente desnaturadas e com agregados insolúveis devido ao pH se encontrar perto do *pI* das proteínas de soja. O tratamento por AP promoveu o aumento da solubilidade das proteínas, principalmente, a 200 MPa, um aumento da hidrofobicidade e maior desdobramento das moléculas do IPS. Valores superiores de pressão (400 e 600 MPa) promoveram um decréscimo do conteúdo de SH livres e a total desnaturação das proteínas com progressivo aumento da hidrofobicidade. A pH ácido os resultados mostraram que o tratamento por AP promoveu a despolimerização parcial dos agregados insolúveis do IPS previamente existentes ao processamento e a subsequente formação de novos agregados com o aumento da pressão aplicada.

A AP também induziu a adsorção das proteínas de soja, particularmente a subunidade β da fração 7S e o polipéptido A da fração 11S, na interface óleo/água de emulsões óleo em água (30/70) (Puppo *et al.*, 2005). Na maioria dos trabalhos apresentados, as amostras proteicas foram submetidas a um processo de secagem por liofilização previamente ao processamento por AP, o que pode alterar as propriedades das proteínas e assim, mascarar o real efeito da AP nas funcionalidades das proteínas de soja. Assim, Wang *et al.* (2008) investigaram o efeito da AP em algumas propriedades físico-químicas e funcionais de IPS sem liofilização. Dispersões neutras a diferentes concentrações proteicas, 1, 3 e 5 %, foram submetidas a três pressões diferentes: 200, 400 e 600 MPa. Na gama de pressões aplicadas,

o processamento resultou num ligeiro mas gradual decréscimo da solubilidade e num aumento significativo da hidrofobicidade superficial. Contudo, Li *et al* (2011) demonstrou que a variação da solubilidade varia em função do valor de pressão aplicado, constatando que a solubilidade de dispersões de IPS com uma concentração de proteína de 1 % a pH 3 e 6.8, aumentou significativamente no intervalo 200-300 MPa. No entanto, o progressivo aumento da pressão resultou no decréscimo gradual mas significativo da solubilidade.

O conteúdo em grupos sulfidrilo livres é também influenciado pelo valor de pressão aplicado nos processamentos, verificando-se o seu aumento com processamentos a 200 MPa e o seu gradualmente decréscimo com o aumento progressivo dos valores de pressão aplicados (Wang *et al.*, 2008).

A capacidade gelificante de IPS, induzida por aquecimento, foi influenciada pelos tratamentos por AP, diminuindo com o tratamento por AP (Wang *et al.*, 2008). Os resultados permitiram constatar que a influência da AP nos parâmetros analisados relaciona-se com a concentração da solução proteica submetida à AP, mostrando assim que a AP pode ser utilizada para modificar as propriedades das proteínas de soja, selecionando especificamente para cada objetivo, a concentração proteica e os níveis de pressurização.

Speroni *et al.* (2009) centraram o seu estudo na influência do processamento por AP nas propriedades gelificantes das dispersões de IPS e das globulinas 7S e 11S e tentaram relacionar os efeitos observados com as alterações estruturais sofridas pelas moléculas proteicas durante o processo de pressurização. Efeitos distintos foram observados para as três dispersões proteicas analisadas. A 600 MPa observou-se a gelificação da globulina 7S sem alterações nas propriedades reológicas da 11S, apesar da sua total desnaturação. A formação de filamentos de proteínas foi observada na microestrutura das dispersões processadas por AP de IPS e da globulina 7S, corroborando com o seu comportamento reológico de gel fraco. No caso da globulina 11S, as alterações induzidas pela AP na microestrutura (aparecimento de grânulos grandes) não foram acompanhadas por alterações reológicas significativas. O tratamento térmico após processamento por AP induziu a gelificação proteica. Registou-se uma diminuição da temperatura de gelificação da globulina 7S e do IPS, efeito também descrito em trabalhos posteriores (Speroni *et al.*, 2010). A magnitude deste efeito foi proporcional à intensidade do tratamento por AP. Contrariamente, a AP promoveu um aumento do tempo de gelificação das dispersões da

globulina 11S. Estas observações podem resultar do fato do processamento por AP aumentar a estabilidade térmica da glicinina mas diminuir a da β -conglucina (Añón *et al.*, 2011). A estabilidade térmica, traduzida por um aumento da temperatura de desnaturação da proteína, é favorecida pela adição de NaCl (Añón *et al.*, 2011). Por outro lado, para todas as dispersões em estudo, o tratamento por AP diminuiu a capacidade de estabelecimento de interações hidrofóbicas durante o aquecimento e de ligações de hidrogénio durante o arrefecimento, resultando em géis mais fracos (Speroni *et al.*, 2009). A adição de cálcio aumentou significativamente a rigidez dos géis obtidos de IPS, para concentrações de proteína de 8 e 10 %, possivelmente como consequência da participação dos iões na formação de pontes entre resíduos carregados negativamente (Speroni *et al.*, 2010).

5.1.2 Efeito da alta pressão nas propriedades estruturais de proteínas

O mecanismo subjacente às alterações das propriedades funcionais das proteínas com o processamento por AP é geralmente atribuído a alterações estruturais sofridas durante o processamento, nomeadamente, a desnaturação proteica e subsequente agregação, via interações hidrofóbicas, induzidas pelo tratamento por AP.

Puppo *et al.* (2004) utilizaram o dicroísmo circular para investigar a influência da AP na estrutura secundária dos IPS a dois valores de pH (3 e 8). Os resultados mostraram que o conteúdo em α -hélices diminuiu e a quantidade de moléculas em conformação desordenada aumentou com o aumento dos valores de pressão aplicados (200-600 MPa).

A região da amida I ($1700 - 1600 \text{ cm}^{-1}$) no espectro de FT-IR de proteínas é uma das mais úteis para a análise e elucidação da estrutura secundária (Byler e Susi, 1986). Alvarez *et al.* (2008) utilizaram a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) para estudar as alterações estruturais das proteínas de um concentrado de proteínas de soja induzidas por AP. Estes autores demonstraram o predomínio das bandas localizadas a 1632 e 1646 cm^{-1} , revelando que a estrutura secundária das proteínas de soja consiste predominantemente em folhas β antiparalelas e zonas desordenadas, o que está de acordo com resultados prévios obtidos noutros trabalhos (Nagano *et al.*, 1994; Mills *et al.*, 2003). Submetendo um concentrado proteico a um tratamento a 250 MPa observou-se a diminuição de intensidade das bandas a 1692 e 1622 cm^{-1} , atribuídas, respetivamente, a

voltas β (β -turns) e folhas β paralelas. Por outro lado, após o processamento por AP as duas principais bandas (1632 e 1646 cm^{-1}) aumentaram de intensidade embora se tenha registado um aumento da proporção das estruturas desordenadas (1646 cm^{-1}) relativamente às folhas β antiparalelas (1632 cm^{-1}).

Tang e Ma (2009) focaram o seu trabalho no efeito da AP sobre a agregação e propriedades estruturais de isolados de proteína de soja. Por desconvolução dos espectros, foi possível observar mais detalhadamente a região da amida I e amida II, regiões relacionadas, respetivamente, com a estrutura secundária e terciária das proteínas. Os espectros das proteínas não sujeitas a AP revelaram a existência de doze bandas na região da amida I. Para além das bandas já referidas no trabalho de Alvarez *et al.* (2008), os resultados obtidos permitiram observar duas bandas localizadas a 1682 e 1618 cm^{-1} , frequentemente associadas a processos de agregação das proteínas (Lefèvre e Subirade, 2001). A presença destas bandas é consistente com o facto das frações proteicas constituintes do isolado de proteína de soja, a pH neutro, estarem na forma de agregados. A região da amida I das amostras processadas por AP, revelou alterações que indicam a ocorrência de um gradual desdobramento das proteínas com a aplicação da pressão. Wang *et al.* (2008) comprovaram que para valores de pressão superiores a 400 MPa, as proteínas constituintes do isolado encontram-se quase totalmente desnaturadas sendo as estruturas em α -hélice e folhas β da glicinina destruídas e convertidas em estruturas aleatórias (*random coil*) após processamento a 500 MPa por 10 min (Zhang *et al.*, 2003).

Foi demonstrado recentemente que as alterações estruturais sofridas pelas proteínas de soja, induzidas pelo processamento por AP, favorecem o decréscimo do efeito alergénico destas proteínas, sendo a intensidade deste efeito sensível ao valor de pressão aplicado e tempo de tratamento (Li *et al.*, 2012). Estes resultados contribuem para o alargamento da aplicação de proteínas de soja, nomeadamente para formulações infantis.

Desta forma, conhecer as modificações estruturais ocorridas durante o processamento por AP pode contribuir para uma melhor compreensão e explicação das alterações funcionais sofridas pelos isolados proteicos após esse processamento.

5.1.3 Efeito da alta pressão nas interações proteínas-polissacarídeos

A interação entre proteínas e polissacarídeos exerce influência direta sobre as propriedades macroscópicas dos alimentos. No capítulo 1 desta tese, este assunto foi revisto e foram abordados os fatores importantes que influenciam o tipo de interação que se estabelece entre proteínas e polissacarídeos.

As ligações não covalentes das proteínas e moléculas maiores são alteradas durante tratamentos por AP (O'Reilly *et al.*, 2001) e as alterações conformacionais já referidas anteriormente podem dar origem a novas interações intermoleculares entre diferentes macromoléculas, por exemplo, proteínas e polissacarídeos.

Alguns estudos sobre o efeito da AP nas propriedades funcionais de misturas proteína-polissacarídeo, incluindo proteínas de soja, são encontrados na literatura (Galazka *et al.*, 1999; Dickinson e James, 2000; Galazka *et al.*, 2000c; Abbasi e Dickinson, 2004; Gancz *et al.*, 2005; Laplante *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2013). Contudo, existe pouca diversidade de polissacarídeos utilizados, sendo carrageninas e pectinas os polissacarídeos mais frequentemente estudados.

Galazka, Dickinson e Ledward dedicaram vários trabalhos ao estudo dos efeitos da AP em diferentes misturas proteína-polissacarídeo. Galazka *et al.* (1999a) compararam o efeito do tratamento térmico ($> 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 min) e do tratamento por AP ($> 250\text{ MPa}$ por 20 min) nas propriedades emulsionantes da globulina 11S da *Vicia faba* (pH 8) misturada com ι - ou κ -carragenina. Com o aumento da temperatura do tratamento ou do valor de pressão aplicada observou-se uma diminuição na eficiência de emulsificação e na estabilidade da emulsão. A adição de ι - ou κ -carragenina à proteína, a baixa força iônica, levou à formação de gotículas menores, cujo tamanho decresceu com o aumento da concentração de polissacarídeo e da pressão aplicada ($> 200\text{ MPa}$). A presença de ι -carragenina levou à obtenção das menores gotículas na emulsão fresca e a uma maior estabilidade em relação ao comportamento visual da emulsão já preparada. Em todas as condições estudadas, a presença de ι -carragenina melhorou a estabilidade da emulsão. No entanto, a presença de κ -carragenina nas amostras tratadas ($< 75\text{ }^{\circ}\text{C}$) e não tratadas termicamente promoveu rápida separação do soro, provavelmente devido à ocorrência de floculação por depleção. A força de interação da globulina 11S com ι - ou κ -carragenina dependeu da densidade de

carga do polissacarídeo. Em geral, a presença de polissacarídeos nas amostras submetidas ao tratamento térmico e à AP inibiu a formação de agregados.

No seguimento do trabalho anterior, Galazka *et al.* (1999b) submeteram misturas de albumina de soro bovino (BSA) (5 mg/mL) e ι - ou κ -carragenina, a pH neutro e baixa força iônica, a um tratamento por AP a 600 MPa por 20 min. Os resultados revelaram uma redução da hidrofobicidade superficial da proteína. A presença do polissacarídeo reduziu a entalpia e a temperatura de desnaturação da BSA. Os resultados da cromatografia de exclusão molecular, a baixa força iônica, mostraram que a fraca interação eletrostática entre a BSA e a ι ou κ -carragenina, a pH 7, intensificou-se com a diminuição do valor do pH. A interação entre a BSA e a carragenina, em condições de baixa força iônica, protegeu a proteína globular de sofrer agregação com o tratamento por AP.

No ano 2000, os mesmos autores, avaliaram o efeito da AP nas interações ovalbumina-polissacarídeos (sulfato de dextrano e ι -carragenina), na proporção 1:0.5 (m/m). O tratamento por aplicação de pressões entre 400 e 600 MPa promoveu um aumento da hidrofobicidade superficial da proteína mas valores superiores a 600 MPa resultaram no decréscimo da hidrofobicidade superficial das misturas ovalbumina-sulfato de dextrano. Resultados de cromatografia de exclusão molecular revelaram a formação de complexos proteína-polissacarídeo, com o processamento por AP, a baixa força iônica e a pH 6.5. As emulsões preparadas com biopolímeros processados (600 MPa) apresentaram maior capacidade emulsificante. Com o tratamento por AP a pH ≤ 6.5 , a ovalbumina formou complexos eletrostáticos reversíveis e a intensidade da interação foi relacionada, tal como no trabalho de Galazka *et al.* (1999a), com a densidade de carga do polissacarídeo (sulfato de dextrano > ι -carragenina > κ -carragenina) (Galazka *et al.*, 2000c).

Dickinson e James (2000) estudaram a influência do tratamento por AP (200-800 MPa por 30 min.) nas interações entre β -lactoglobulina e pectina, de baixo grau de esterificação, em emulsões óleo em água e em géis. Estes autores observaram que as emulsões óleo em água preparadas por mistura de soluções de β -lactoglobulina, pectina e óleo de soja, processadas por AP, exibiram flocculação das gotículas, a qual foi sensível à pressão aplicada, concentração de pectina e pH. As alterações reológicas da emulsão foram mais evidentes a valores de pH mais baixos, particularmente próximos do *pI* da proteína. Mudanças no

comportamento da emulsão indicaram a complexação da proteína e pectina induzida pelo tratamento por AP. A pH neutro, a presença do polissacarídeo e o aumento das pressões aplicadas contribuíram para o fortalecimento do gel.

Abbasi e Dickinson (2004) analisaram o efeito da AP nas propriedades gelificantes de misturas de caseína micelar (até 8 % (m/m)) e κ -carragenina (até 1 % (m/m)). Estes autores constataram que as amostras não processadas gelificaram a concentrações de caseína e κ -carragenina mais elevadas. Para os valores mais baixos de concentração, os sistemas exibiram comportamento de líquido (sol), observando-se, em certos casos, a ocorrência de sinerese ou separação de fases. Em contraste, quase todas as amostras processadas por AP gelificaram, independentemente da concentração dos biopolímeros. No entanto, apenas alguns dos géis foram termorreversíveis, comportamento característico dos géis de carragenina e os formados por adição de baixas concentrações de κ -carragenina revelaram sinerese significativa. Os resultados desta pesquisa confirmaram a existência de uma interação eletrostática associativa entre os dois biopolímeros altamente dependente do conteúdo em íões cálcio. Assim, devido à destruição da estrutura micelar das caseínas, ao consequente aumento dos íões cálcio livres e à interpenetração dos dois biopolímeros promovidos pelo tratamento por AP, as propriedades reológicas dos géis obtidos por AP são significativamente diferentes dos géis obtidos por tratamento térmico.

Recentemente, Yuan *et al.* (2013) demonstraram a capacidade da AP para melhorar as propriedades emulsionantes de misturas entre proteínas do soro do leite e quitosana. Foram avaliadas diferentes razões proteína/polissacarídeo, para tempos (10-30 min) e pressurizações distintas (0-600 MPa). Os resultados demonstraram que o processamento conduziu a uma distribuição mais homogênea do tamanho das gotículas e a maior estabilidade das emulsões formadas, o que foi atribuído ao aumento da viscosidade da emulsão como resultado da presença do polissacarídeo. Contudo, a proporção de quitosana na mistura demonstrou ser um fator determinante do tipo de efeito da alta pressão, uma vez que misturas com elevada quantidade de polissacarídeo (razão proteína/polissacarídeo=1:8) apresentaram um decréscimo da estabilidade da emulsão em virtude da ocorrência de processos de depleção.

Desta forma, apesar dos trabalhos já realizados sobre o efeito da AP nas interações proteína-polissacarídeos, estes são claramente reduzidos no que respeita ao tipo de proteínas e polissacarídeos estudados. Para além disso, os efeitos da AP observados, quer a nível interfacial quer na gelificação destes biopolímeros, mostram ser diversos e dependentes de muitos fatores específicos para os biopolímeros em estudo.

Assim, com esta parte do trabalho pretendeu-se colmatar algumas falhas e aprofundar os conhecimentos sobre o efeito da AP nas propriedades funcionais e estruturais de isolados de proteínas de soja e das misturas de isolado de proteína de soja com polissacarídeos, a pH neutro. Para tal, utilizaram-se valores de pressão e um tipo de polissacarídeo (neutro, não gelificante) ainda pouco explorado na literatura. Foi ainda objetivo deste capítulo compreender a influência das características iniciais do IPS, resultantes de métodos de extração diferentes (industrial e laboratorial), nos efeitos do processamento por AP, sobre as proteínas de soja.

5.2 Materiais e Métodos

5.2.1 Preparação das soluções de proteína de soja

Neste trabalho foram utilizados dois isolados de proteína de soja, um comercial – *SAMPROSOY 90 EG* (IPS5, designado por IPS_C) cedido gentilmente por Bunge Alimentos (Brasil), com a composição descrita no Capítulo 2 (§ 2.3.1) e um isolado de soja obtido laboratorialmente, a partir de farinha de soja desengordurada e seca (IPS4, designado por IPS_L), pelo procedimento descrito no Capítulo 2 (§ 2.2.2.2) e igualmente caracterizado nesse capítulo.

As soluções de IPS_C e IPS_L foram preparadas dissolvendo lentamente e sob agitação magnética, a quantidade apropriada de IPS em água ultrapura *mili-Q* (resistividade 18.2 MΩcm), de forma a obter-se uma solução de IPS de concentração, aproximadamente, 4 % e o pH ajustado a 7, quando necessário. Adicionou-se, como conservante, azida de sódio (0.02 %), de forma a evitar o desenvolvimento microbiano.

As soluções de IPS foram mantidas a 4 °C com agitação moderada, durante 6 h. A concentração final da solução de IPS foi calculada por determinação dos sólidos totais dissolvidos, após secagem das dispersões a 105 °C, até obter massa constante.

Trabalhos descritos na literatura (Dumoulin *et al.*, 1998; Molina *et al.*, 2002) e ensaios realizados preliminarmente mostraram que, de acordo com a concentração da solução de IPS processada, o tratamento por AP pode conduzir à gelificação do isolado proteico. Como não era esse o objetivo pretendido, as soluções de IPS foram diluídas, 2 h antes do processamento, de forma a apresentarem concentrações relativamente baixas (2 %). Após diluição com água ultrapura *mili-Q*, a solução ficou em agitação moderada de forma a garantir a total homogeneização.

5.2.2 Preparação das soluções de galactomanana

A galactomanana selecionada para esta parte do trabalho foi a goma de alfarroba purificada, de maior massa molecular (GA0), com as propriedades descritas no Capítulo 3. A seleção desta GM baseou-se nos resultados obtidos em capítulos anteriores onde ficou demonstrada a maior influência desta amostra de GM nas propriedades funcionais das proteínas de soja.

A solução de GA foi preparada de acordo com o procedimento descrito na secção 3.2.3.1 do capítulo 3, a uma concentração aproximada de 1.5 % (m/v). A concentração rigorosa da solução de polissacarídeo foi determinada por resíduo seco a 105 °C.

5.2.3 Preparação das misturas IPS/GA

As misturas de IPS e GA efetuaram-se por adição de dispersões de cada biopolímero, de acordo com o descrito em § 3.2.3.3, com concentração inicial e proporção mássica adequadas para a concentração final pretendida (2 % IPS e 0.1 % de GA). Cada mistura foi submetida a agitação lenta durante 2 h à temperatura ambiente.

5.2.4 Processamento por alta pressão

As dispersões foram transferidas para frascos de polietileno apropriados para AP e acondicionados sob vácuo em sacos de polietileno selados termicamente. Os tratamentos por AP foram realizados em equipamento de pressão hidrostática (Unipress Equipment, Modelo U33, Polónia) (Figura 5.1), com um vaso de pressurização de 100 mL (35 mm de diâmetro e 100 mm de altura), ligado a um banho termostaticado para controlo de temperatura. Previamente aos ensaios, a temperatura, do vaso de pressurização e de cada uma das amostras a processar, foi equilibrada a 20 °C. Tratamento semelhante foi também aplicado às amostras controlo (IPS e mistura IPS-GA).

A compressão foi efetuada a uma taxa de 400 MPa/min e a temperatura durante o processamento foi controlada de forma a evitar o sobreaquecimento. Resultante do aquecimento adiabático, a temperatura atingiu valores de 23 °C (± 1 min) que rapidamente foram equilibrados para os 20 °C. Foi utilizada uma mistura propilenoglicol/água (60:40) como meio líquido para a transmissão da pressão.



Figura 5.1 - Equipamento de pressão hidrostática Unipress Equipment, Modelo U33

Realizaram-se ensaios preliminares para seleção das condições de processamento a aplicar. Para isso, testaram-se diferentes tempos de processamento (5, 15 e 30 min.) e diferentes

valores de pressão (50, 100, 300 e 450 MPa). Não foi possível processar a pressões superiores por uma limitação de equipamento.

Por uma questão de gestão de amostra, iniciou-se o estudo do efeito da AP, nas propriedades funcionais e estruturais do IPS, com o isolado comercial (IPS_C). Após análise dos resultados, selecionaram-se algumas condições de processamento para aplicar às amostras de IPS obtidas laboratorialmente (IPS_L), de forma a ser possível efetuar a comparação dos efeitos da AP nos dois tipos de isolado proteico.

Após o processamento, todas as amostras, incluindo os controlos, foram congeladas com azoto líquido, liofilizadas e conservadas em exsiccador.

5.2.5 Avaliação dos efeitos da alta pressão nas propriedades físico-químicas e funcionais do IPS e das misturas IPS/GA

Todas as amostras, processadas e não processadas, foram analisadas quanto ao grau de turbidez, solubilidade, conteúdo em grupos SH livres, tamanho de partículas, composição proteica da fração solúvel das amostras, atividade emulsionante e propriedades gelificantes.

5.2.5.1 Solubilidade

Para determinação da solubilidade de cada uma das amostras em estudo, prepararam-se dispersões a 1 % (m/v) de proteína, de cada amostra liofilizada, em água ultrapura *Mili-Q* e manteve-se uma agitação durante 1 h à temperatura ambiente. De seguida, centrifugou-se a 10000 rpm (rotor 12159 Sigma), 20 °C por 15 min e a fração solúvel foi filtrada em papel Whatman nº 01. Retiraram-se aliquotas de 1 mL às quais se acrescentou 9 mL de meio de solubilização. A concentração de proteína solúvel foi determinada espectrofotometricamente a 280 nm, utilizando como coeficiente de extinção molar $E^{0.1\%}_{1\text{cm}} = 1.204$ (Puppo *et al.*, 1995). A solubilidade proteica foi expressa como a razão entre a proteína solúvel e a proteína total (determinada por análise elementar).

5.2.5.2 Turbidez

Cada amostra liofilizada foi adicionada lentamente em: a) água ultra pura *Mili-Q*; b) solução tampão 0.086 mol/L Tris-HCl, 0.09 mol/L glicina, 0.004 mol/L Na₂EDTA (pH 8) (Tris/Gli); c) solução b) contendo 6 mol/L de ureia e 0.5 % de dodecil sulfato de sódio (SDS) (T/U-SDS); d) solução c) contendo 10 mmol/L de ditioeritritol (DTT) (T/U-SDS/DTT). As dispersões permaneceram em agitação moderada durante 1 h. A turbidez de cada uma das dispersões, a 0.5 % (m/v) de proteína, foi determinada por leitura em espectrofotómetro *Jenway 6405 UV/Vis spectrophotometer* a 600 nm. As medidas foram realizadas a temperatura ambiente e em triplicado.

5.2.5.3 Grupos sulfidrilo livres (SH)

O conteúdo em grupos sulfidrilo livres das amostras submetidas a AP e das amostras controlo foi determinado de acordo com o método descrito na secção 2.2.3.7 do capítulo 2.

5.2.5.4 Distribuição de tamanhos de partículas

Dispersões de todas as amostras, controlo e processadas, foram preparadas em água ultrapura *Mili-Q* a uma concentração de 0.5 mg/mL. Manteve-se em agitação vigorosa durante 2 h à temperatura ambiente. As dimensões das partículas constituintes das amostras foram determinadas, à temperatura ambiente, no equipamento *ZetaSize nanoseries* (Malvern), em cuvette de plástico. Os ensaios de DLS (*Dynamic Light Scattering*) foram realizados a um ângulo de deteção de 90° de forma a fornecer informações sobre o tamanho hidrodinâmico das partículas.

5.2.5.5 Composição da fração proteica solúvel das amostras

5.2.5.5.1 Preparação da fração solúvel das amostras

Prepararam-se dispersões, a 1.00 % (m/v), de cada uma das amostras nos seguintes tampões: *a)* Tris/Gli; *b)* T/U-SDS e *c)* T/U-SDS/DTT. As dispersões foram deixadas 1 h em agitação e de seguida foram centrifugadas (10000 rpm, 20 °C por 15 min). Recuperou-se o sobrenadante.

5.2.5.5.2 Separação electroforética

A separação electroforética foi efetuada num sistema Mini Protean II (BioRad) em gel de poli(acrilamida na presença de dodecil-sulfato de sódio como agente dissociante (Laemmli, 1970). Ensaaios preliminares revelaram que a composição ideal do gel seria: 12.5 % de acrilamida e 0.4 % de bis-acilamida em Tris/HCl 1.5 mol/L, pH 8.8, na presença de SDS 0.1 % (m/v). O gel concentrador foi constituído por 4 % de acrilamida e 0.4 % de bis-acrilamida em Tris/HCl 0.5 mol/L, pH 6.8 na presença de SDS 0.1 % (m/v). A polimerização dos géis foi iniciada com N,N,N',N' – tetrametiletenodiamina 42.5 mmol/L e catalisada por persulfato de amónio 0.05 % (m/v).

Retirou-se uma alíquota do sobrenadante, obtido de acordo com a secção 5.2.5.5.1 e adicionou-se tampão amostra de eletroforese (Tris 62.5 mmol/L pH 6.8, SDS 2 % (m/v), glicerol 10 % (v/v), azul de bromofenol 0.01 % (m/v)) de forma a obter-se uma concentração de 2.0 µg/µL. As amostras assim preparadas foram aquecidas a 100 °C por 5 min e em seguida foram aplicados 10 µL no gel. A separação electroforética decorreu a 150 V (fonte BioRad Power-Pac 300) em solução de Tris 25 mmol/L, glicina 0.192 mol/L, pH 8.3 e SDS 0.1 %.

5.2.5.5.3 Revelação das proteínas

A revelação das proteínas separadas por eletroforese foi efetuada utilizando o método de coloração com azul de Coomassie descrito em § 2.2.3.4.

A mobilidade electroforética das proteínas das amostras foi comparada com a mobilidade electroforética de padrões aplicados, em todos os géis, em volume igual ao das amostras: miosina (200 kDa), β -galactosidase (116.5 kDa), fosforilase b (97.4 kDa), albumina (66.2 kDa), ovalbumina do soro (45 kDa), anidrase carbónica (31 kDa), inibidor da tripsina (21.5 kDa), lisozima (14.4 kDa) e aprotinina (6.5 kDa) (Broad Range Markers da BioRad).

Para análise das imagens, cada gel foi digitalizado utilizando “the calibrated imaging Gel-Doc” da BioRad e foi analisado com o *software Quantity One v4.6* (BioRad).

5.2.5.6 Atividade emulsionante

O índice da atividade emulsionante (IAE) e o índice de estabilidade da emulsão (IEE) foi determinado de acordo com o descrito por Wang *et al.* (2008) seguindo o procedimento descrito na seção 4.2.3.8 e os valores de IAE e IEE calculados com base nas equações 4.1 e 4.2 (§ 4.2.3.8).

5.2.5.7 Capacidade gelificante

As características de gelificação dos IPS tratados por AP, na presença ou não de GA, foram avaliadas por ensaios dinâmicos a baixa amplitude de deformação. Promovendo a gelificação *in situ* no sistema de medida do reómetro utilizado. Os ensaios reológicos foram efetuados num reómetro de tensão controlada TA AR-1000, equipado com um sistema *Peltier* de controlo de temperatura e sistema de medida placa-placa (rugosa) com diâmetro de 4 cm e 1 mm de separação entre placas.

As dispersões de IPS foram preparadas por adição da quantidade apropriada de IPS ou mistura IPS/GA a água ultrapura, sob agitação magnética lenta, de forma a obter-se uma dispersão com uma concentração aproximada de 12-13 % (m/v). Adicionou-se azida de sódio (0.02 %) como conservante, de forma a evitar o desenvolvimento microbiano.

Após agitação por 1 h a 4 °C, o pH foi ajustado, à temperatura ambiente, para 7.0. A dispersão de IPS foi mantida a 4 °C com agitação moderada, durante uma noite, para

maximizar a dissolução das proteínas e no final retificou-se o pH. A concentração das dispersões de IPS e das misturas foi determinada por resíduo seco a 105 °C.

As amostras testadas incluíram dispersões a 10 % de IPS e misturas de 10 % de IPS com 0.5 % de GA. Tendo em consideração a baixa solubilidade do IPS_C, como observado no capítulo 2, comparativamente aos IPS_L, não foi possível trabalhar experimentalmente a concentrações superiores de IPS. Por outro lado, a concentração de GA foi selecionada com base nos resultados do capítulo 3, onde se verificaram efeitos mais pronunciados sobre as propriedades gelificantes e emulsionantes das proteínas de soja, por adição de GA a uma concentração de 0.5 %.

Previamente à realização do ensaio reológico, as dispersões foram diluídas para 10 %, com água ultrapura, agitadas por 30 min e desgaseificadas sob vácuo por 30 min, com agitação lenta.

As medições reológicas realizaram-se conforme já descrito em § 2.2.4.2.

5.2.6 Avaliação dos efeitos da alta pressão nas propriedades estruturais do IPS e das misturas IPS/GA

Com base nos resultados obtidos na § 5.2.5, selecionaram-se algumas condições de processamento para estudar as propriedades estruturais das proteínas de soja e suas misturas com GA submetidas a AP.

Para a caracterização estrutural foram realizadas análises espectroscópicas por FT-IR e análises de microscopia eletrónica de varrimento (MEV).

5.2.6.1 Análise espectroscópica por FT-IR

Os espectros de FT-IR das amostras, controlo e processadas selecionadas, foram adquiridos na gama 4000 a 600 cm⁻¹ com resolução 8 cm⁻¹ num espectrómetro *Perkin Elmer* com acessório *Golden Gate* (sistema de ATR de reflexão única), com acumulação de 32 scans. A desconvulsão dos espectros de infravermelho foi realizada com o software *OPUS versão 5.0* (Bruker). Para cada amostra foram adquiridos 5 espectros de infravermelho, os quais foram normalizados e o espectro final foi obtido por média.

5.2.6.2 Análise por microscopia eletrônica de varrimento

As amostras selecionadas foram trituradas e espalhadas nos suportes de alumínio preparado com adesivo de carbono e revestidas com pó de ouro sob vácuo. A análise microscópica realizou-se em microscópio eletrônico *Hitachi SU 4100*, operado a 15 kV.

5.2.7 Análise estatística

Todas as determinações foram efetuadas em triplicado. Os resultados das determinações efetuadas foram expressos em termos das médias das três réplicas e dos respectivos desvios-padrão, à exceção dos obtidos por análises reológicas. Os valores médios obtidos foram comparados recorrendo ao teste *t-student*. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0.05$.

5.3 Resultados e Discussão

5.3.1 Seleção das condições de processamento

Para a seleção das condições de tratamento por AP foram realizados ensaios preliminares, tendo sido determinada a solubilidade e a turbidez das dispersões em água ultrapura dos IPS_C submetidos a diferentes condições de processamento (pressão e tempo).

A análise da Figura 5.2 permite constatar a existência de duas regiões correspondentes a dois efeitos distintos da AP sobre a solubilidade e turbidez das dispersões analisadas.

Na primeira região, compreendida entre 0.1 MPa (controlo) e 100 MPa, verifica-se um aumento progressivo da solubilidade e correspondente diminuição da turbidez. Na segunda região, corresponde a efeitos resultantes da aplicação de pressões maiores, observa-se um comportamento oposto ao da primeira região, isto é, um decréscimo da solubilidade proteica, embora sempre superior ao controlo, acompanhado por um progressivo aumento da turbidez.

No que se refere ao efeito do tempo de pressurização, é possível constatar que os tempos crescentes de tratamento resultaram num progressivo intensificar do efeito resultante do

valor de pressão aplicada. Neste sentido, optou-se por seleccionar um tempo médio de tratamento de 15 min para os ensaios realizados.

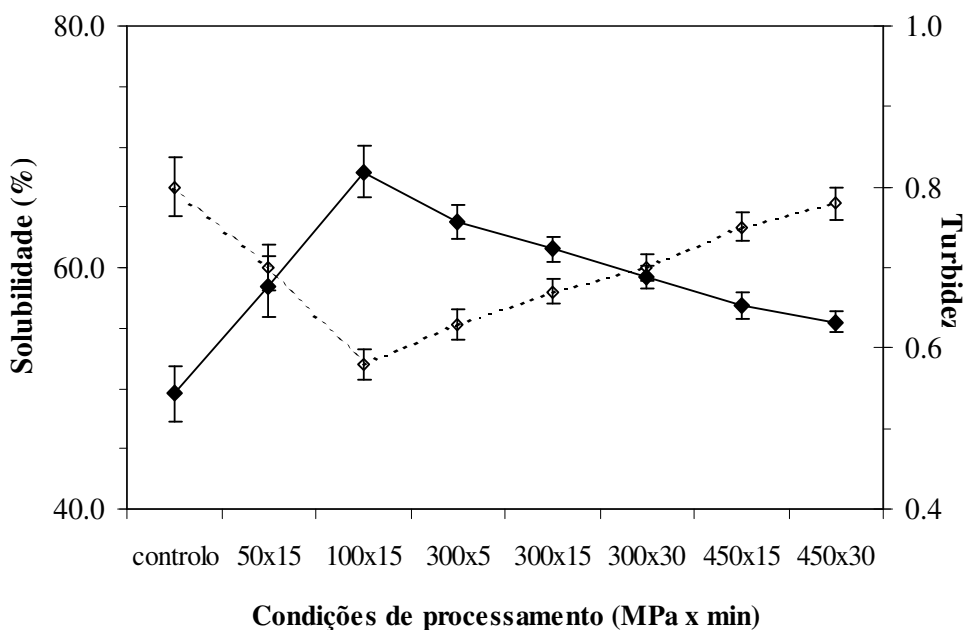


Figura 5.2 - Efeito de diferentes condições de processamento (pressão e tempo) na solubilidade e turbidez, medida como absorvância a 600 nm, das dispersões de IPS_C a pH 7.

5.3.2 Efeito da alta pressão na solubilidade e turbidez de IPS e nas misturas IPS/GA

A solubilidade dos IPS_C e das misturas IPS_C/GA submetidos a diferentes pressurizações (50-450 MPa) é apresentada na Figura 5.3. A solubilidade do IPS_C foi alterada com o tratamento por AP. No intervalo entre 50 e 100 MPa ocorreu um aumento progressivo da solubilidade das dispersões sugerindo uma diminuição do número e/ou tamanho dos agregados com a aplicação crescente de pressão. Este comportamento poderá resultar da rutura, por efeito da AP, das ligações eletrostáticas e hidrofóbicas estabelecidas na formação dos agregados inicialmente existentes no isolado comercial e durante a liofilização. Por outro lado, a estes valores de pressão deve ter ocorrido o desdobramento das globulinas, aumentando assim a interação proteína-solvente e consequentemente a solubilidade das amostras.

A partir de 100 MPa observa-se uma diminuição gradual da solubilidade com o aumento de pressão até 450 MPa. O aumento da pressão aplicada provavelmente resultou numa crescente desnaturação das globulinas constituintes dos IPS, com exposição de grupos hidrofóbicos e de grupos SH, favorecendo a agregação e a perda de solubilidade (Dumay *et*

al.,1994; Galazka *et al.*, 1996a; Molina *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2008; Speroni *et al.*, 2011).

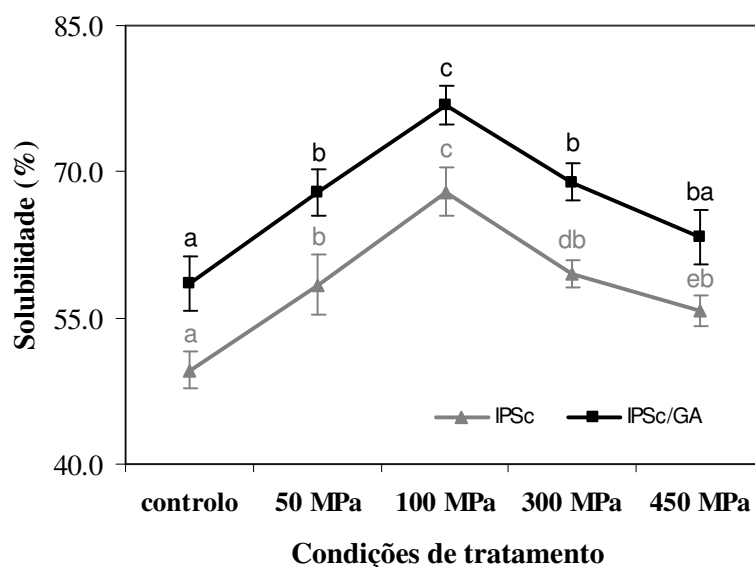


Figura 5.3 - Solubilidade proteica de IPS_C e IPS_C/GA, controle e processados por AP (50-450 MPa por 15 min) a pH 7. Letras diferentes (a-e) nas barras de erro indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre amostras (da mesma natureza) processadas com diferentes valores de pressão.

Contudo, para os tratamentos a 450 MPa/15 min, os valores de solubilidade continuaram a ser superiores aos da amostra controle provavelmente porque alguns dos complexos formados (entre o polipeptido básico da globulina 11S e a subunidade β da globulina 7S) são solúveis (Utsumi *et al.*, 1984).

Esta dualidade de comportamento em função do valor de pressão aplicada foi também reportada por outros investigadores (Puppo *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2011), embora os valores de pressão para os quais se observa a inversão do efeito da alta pressão na solubilidade variem entre alguns dos trabalhos descritos na literatura. Esta diversidade de resultados pode ser justificada por vários fatores, nomeadamente, diferença de origem de cultivos, o que origina diferentes razões 7S/11S nos IPS (Li *et al.*, 2011), diferenças no tratamento inicial das amostras de soja, concentração inicial da dispersão sujeita ao tratamento por AP, o que resulta em diferentes graus de agregação e, consequentemente, valores de solubilidade distintos.

O efeito da AP nas misturas de IPS_C/GA foi semelhante ao observado para o IPS_C. Se compararmos a solubilidade do IPS_C liofilizado com a do IPS_C não liofilizado (capítulo 2 § 2.3.3) verifica-se que a primeira é significativamente menor, o que sugere a ocorrência de processos de agregação durante a liofilização, também descritos por Wang *et al.* (2008).

Por outro lado, a solubilidade da mistura controlo é superior à do IPS_C controlo, o que sugere que a presença de GA de alguma forma diminuiu a ocorrência de agregação durante o processo de liofilização. Provavelmente, à concentração de liofilização, as moléculas de GA intercalaram-se com as moléculas de proteína, o que diminuiu a tendência para as moléculas proteicas interagirem e agregarem durante o congelamento e sublimação do solvente

A agregação de moléculas de proteína conduz à formação de partículas que dispersam a luz e tornam a solução turva (Hermansson, 1979). No seguimento do trabalho, determinou-se a turbidez das dispersões dos IPS_C e das misturas IPS_C/GA, em diferentes solventes, com a finalidade de estimar o grau de agregação proteica e obter informação acerca do tipo de interações responsáveis por essa agregação. Com o objetivo de averiguar a contribuição de cada tipo de interação para a formação de agregados proteicos determinou-se a turbidez em diferentes solventes.

Os resultados obtidos são apresentados na Figura 5.4. O efeito da AP na turbidez das dispersões analisadas relacionou-se com os resultados obtidos para a solubilidade. Em água e em tampão pH 8 (Tris/Gli), entre 50 e 100 MPa observou-se uma diminuição da turbidez que resultou, provavelmente, da diminuição do número de agregados em consequência da rutura das interações responsáveis pela sua formação, relacionando-se assim com o aumento de solubilidade anteriormente observado (Figura 5.3). Na gama de pressões 100 – 450 MPa, a turbidez aumentou gradualmente, sugerindo a formação de agregados como resultado do estabelecimento de ligações entre moléculas proteicas favorecido pelo tratamento por pressão. Este resultado está em concordância com o decréscimo da solubilidade em água nesta gama de pressões, como já discutido anteriormente.

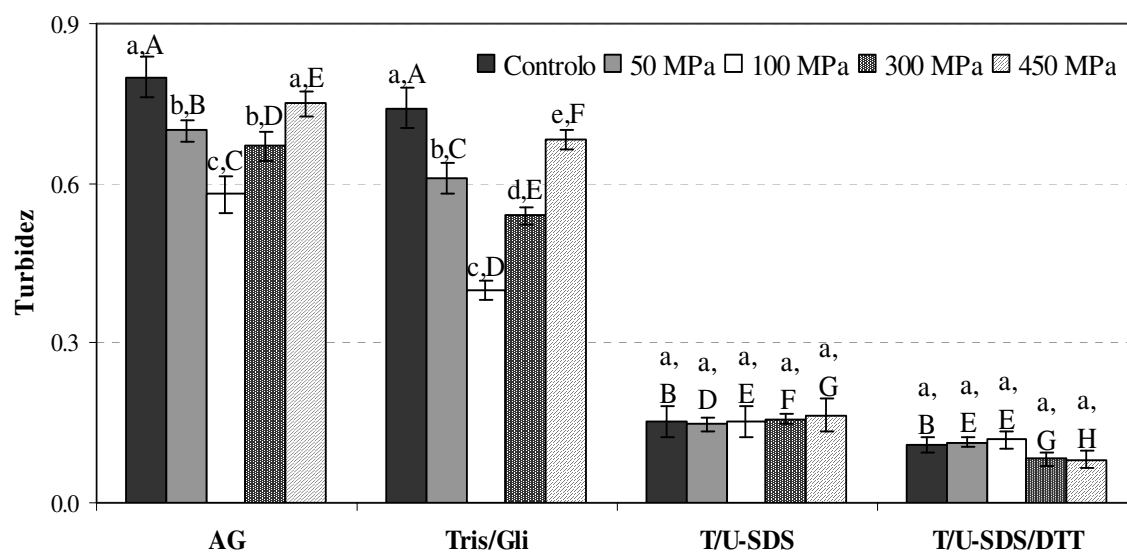


Figura 5.4 - Turbidez em diferentes solventes, AG, Tris/Gli, T/U-SDS e T/U-SDS/DTT, das dispersões de IPSC_C (0.1 % (m/v)), controlo e processados por AP (50-450 MPa por 15 min), a pH 7. Letras minúsculas diferentes (a-e) nas barras de erro indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) de turbidez, no mesmo solvente, entre condições de tratamento diferentes; Letras maiúsculas diferentes (A-H) indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) de turbidez entre solventes, para as mesmas condições de pressão.

Quando o solvente é Tris/Gli registou-se, para todos os valores de pressão aplicados, uma diminuição da turbidez comparativamente à determinada em AG e este decréscimo foi bastante mais acentuado quando o solvente foi T/U-SDS. A resposta de todos os IPSC sugeriu que as interações hidrofóbicas e eletrostáticas foram as principais responsáveis pela formação de agregados, durante o processo de liofilização, posteriormente rompidos por efeito de valores baixos de pressão (≤ 100 MPa) e durante o processamento por AP a valores superiores a 100 MPa. O decréscimo de turbidez, resultante da rutura de interações hidrofóbicas e eletrostáticas por ação combinada da ureia e SDS variou, aproximadamente entre 70 % e 88 % para 100 MPa e 450 MPa, respetivamente.

Quando se analisam os resultados de turbidez das dispersões contendo DTT, pode-se inferir sobre a contribuição das pontes dissulfureto para a formação de agregados. Constatou-se um decréscimo de turbidez entre 22 % e 50 %, respetivamente, para 100 MPa e 450 MPa.

Estudo semelhante foi efetuado para as misturas IPSC/GA e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 5.5.

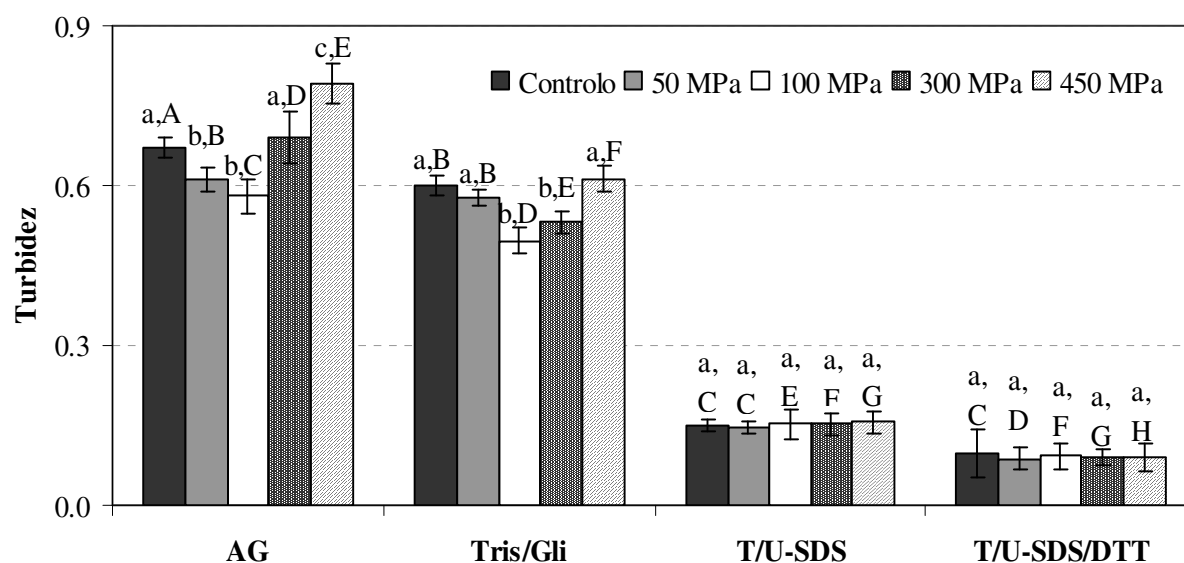


Figura 5.5 - Turbidez em diferentes solventes, AG, Tris/Gli, T/U-SDS e T/U-SDS/DTT, das misturas (0.1 % (m/v)) de IPS_C /GA, controlo e processadas por AP (50-450 MPa por 15 min), a pH 7. Letras minúsculas diferentes (a-c) nas barras de erro indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) de turbidez, no mesmo solvente, entre condições de tratamento diferentes; Letras maiúsculas diferentes (A-H) indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) de turbidez entre solventes, para as mesmas condições de pressão.

A presença da GA não alterou significativamente o efeito da AP sobre a turbidez das dispersões de IPS_C, ou seja, sobre as possíveis interações que se podem desenvolver entre as proteínas de soja tratadas por AP e sobre a sua solubilidade, verificando-se também um decréscimo acentuado da turbidez das dispersões mistura IPS_C/GA no solvente T/U-SDS e em T/U-SDS/DTT comparativamente com os solventes AG e Tris/Gli.

No caso das misturas de IPS_C com GA, observou-se que nos solventes AG e Tris/Gli o efeito dos diferentes valores de pressão aplicados resultou em menores diferenças de turbidez do que as observadas para o IPS_C (Figura 5.4), o que poderá resultar de um efeito baroprotector do polissacarídeo.

De forma a avaliar o efeito do tratamento por AP em IPS com origem e método de extração diferente do isolado comercial, processou-se a 100 MPa e 450 MPa, amostras de um IPS obtido laboratorialmente, a pH 7 (IPS_L).

Os valores de turbidez e solubilidade das amostras de IPS_L e das misturas IPS_L/GA processadas e liofilizadas são apresentados na Figura 5.6.

No que respeita à solubilidade, observou-se uma diferença significativa na solubilidade das amostras comercial e laboratorial não tratadas (controlo). A amostra IPS_C apresentou uma solubilidade inferior à amostra preparada no laboratório (IPS_L).

O aumento da pressão entre 0.1 e 100 MPa não provocou uma alteração significativa na solubilidade da amostra IPS_L, mas claramente aumentou a solubilidade da amostra IPS_C.

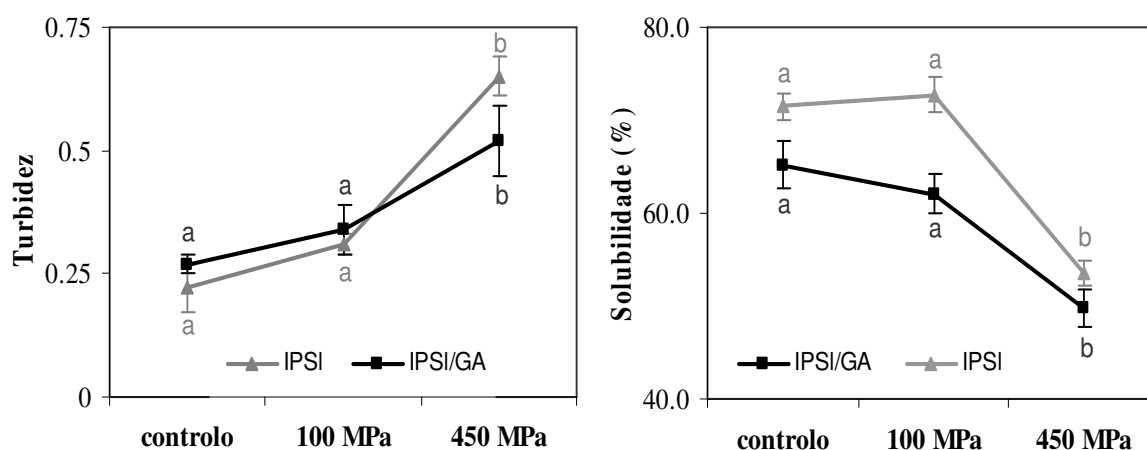


Figura 5.6 – Turbidez e solubilidade proteica de IPS_L e IPS_L/GA, controlo e processados por AP (100 e 450 MPa por 15 min) a pH 7. Letras diferentes (a-e) nas barras de erro indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre amostras (da mesma natureza) processadas com diferentes valores de pressão.

O aumento da pressão para 450 MPa promoveu o aumento de turbidez provavelmente devido à formação de agregados de elevada massa molecular resultantes da exposição de resíduos hidrofóbicos. Este comportamento foi acompanhado por uma diminuição de solubilidade sugerindo que os agregados formados são insolúveis. Os efeitos do tratamento por AP nas misturas IPS_L/GA foram semelhantes aos registados para o IPS_L. Mais uma vez a presença do polissacarídeo parece ter um efeito baroprotector, principalmente a 450 MPa, onde não se regista nem um aumento tão acentuado de turbidez nem uma diminuição tão pronunciada de solubilidade.

Curiosamente, a turbidez do IPS_L, controlo e tratado a 100 MPa, é menor do que a da mistura IPS_L/GA, contrariamente ao observado para o IPS_C. Provavelmente este comportamento resulta do facto da amostra IPS_L não estar tão desnaturada (como se comprovou nos resultados do capítulo 2 secção § 2.3.7) o que diminui a tendência para agregar durante o processo de liofilização. Assim, as misturas IPS_L/GA apresentaram maior turbidez do que os IPS_L em consequência da presença do polissacarídeo.

5.3.3 Efeito da alta pressão no conteúdo em grupos sulfidrilo dos IPS e das misturas IPS/GA

A Figura 5.7 mostra os valores de SH livres dos IPS_C e das misturas IPS_C/GA, controlo e processados a diferentes pressões. O conteúdo em grupos SH livres das amostras em estudo foi influenciado pelo tratamento por AP e este efeito foi primariamente atribuído à rutura de ligações não covalentes intramoleculares (Messens *et al.*, 1997).

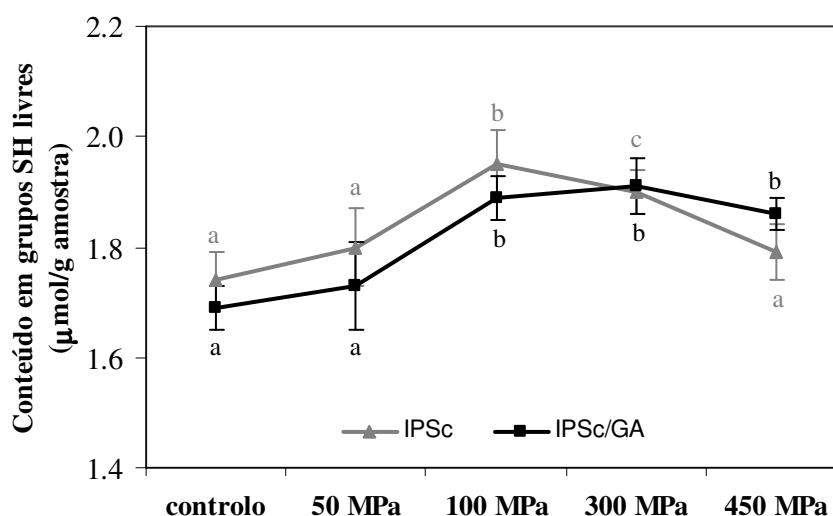


Figura 5.7 – Conteúdo em grupos SH livres de IPS_C e misturas IPS_C/GA, controlo e processados por AP (50-450 MPa por 15 min) a pH 7. Letras diferentes (a-d) nas barras de erro indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre amostras (do mesmo tipo) processadas com diferentes valores de pressão.

Valores de pressão de 50 MPa não desencadearam efeitos significativos sobre o conteúdo em grupos SH livres. No entanto, tratamentos moderados (100 MPa) conduziram a um aumento significativo ($p < 0.05$) dos grupos SH, verificando-se que para valores de pressão superiores a 100 MPa, o conteúdo em grupos SH diminuiu progressiva e significativamente ($p < 0.05$) com o aumento da pressão aplicada (Figura 5.7).

Os resultados obtidos sugerem que pressões moderadas promovem o desenrolar da proteína tornando os grupos sulfidrilo, inicialmente situados no interior das proteínas, acessíveis ao reagente de Ellman. A rutura de interações hidrofóbicas e eletrostáticas responsáveis pela estabilização dos agregados existentes nas amostras também poderá ter contribuído para a maior acessibilidade entre o reagente e os grupos SH. Por outro lado, a

valores baixos de pressão, os grupos SH livres deverão ser estáveis e sem grande tendência para estabelecer ligações.

Aumentando a pressão para valores superiores a 100 MPa observou-se o decréscimo do conteúdo em grupos SH sugerindo a ocorrência de desnaturação e subsequente agregação/reassociação das proteínas desnaturadas por ação da AP, corroborando os resultados de solubilidade e turbidez.

Resultados semelhantes foram descritos por vários investigadores para proteínas de soja (Puppo *et al.*, 2004, Torrezan *et al.*, 2007, Wang *et al.*, 2008) e para outras proteínas, por exemplo, β -lactoglobulina a pH neutro (Funtenberger *et al.*, 1995).

Como já referido anteriormente, a ambiguidade de resultados encontrados na bibliografia sobre este assunto é considerável. Contrariamente ao obtido pelos autores anteriormente referidos, Zhang *et al.* (2003) observou um gradual aumento no conteúdo de grupos SH livres de amostras de glicinina processadas na gama de pressões 0 a 600 MPa.

Relativamente ao efeito da AP no conteúdo em grupos SH livres das misturas IPS_C/GA, a Figura 5.7 mostra que o efeito é semelhante ao descrito para o IPS_C. Contudo, a intensidade do efeito, mais uma vez, revelou-se menor possivelmente devido à presença da GA que desempenhou um efeito baroprotector, diminuindo a extensão das alterações conformacionais da proteína e a quantidade de interações hidrofóbicas rompidas e, provavelmente, também dificultou o acesso do reagente de Ellman aos grupos SH livres.

Na gama de pressões entre 100 e 450 MPa não se registou um efeito significativo da AP no conteúdo em grupos SH livres. Estes resultados poderão relacionar-se com as conclusões inferidas a partir da análise da Figura 5.5. Para a mistura IPS_C/GA, no solvente T/U-SDS/DTT, não se observaram diferenças de turbidez significativas entre as diferentes pressões aplicadas, contrariamente ao observado para o IPS_C sem polissacarídeo. Assim, os resultados sugerem que a presença de GA dificulta a formação de ligações S-S entre subunidades proteicas durante o processamento a 300 ou 450 MPa, o que poderá justificar o conteúdo em SH não ser afetado pelo processamento a estas pressões.

A Figura 5.8 apresenta os conteúdos dos grupos SH livres dos IPS laboratoriais e respetivas misturas com GA. Comparando os dois tipos de isolados verifica-se que a amostra laboratorial apresenta valores muito inferiores aos determinados para a amostra

comercial. Esta constatação pode relacionar-se com a existência, nos isolados obtidos laboratorialmente, de agregados AB estabelecidos por ligações S-S entre os polipéptidos A e B da glicinina que não existem nas amostras comerciais (comparar os perfis electroforéticos apresentados na Figura 5.10 A e B). Assim, os grupos SH estão envolvidos em ligações dissulfureto não estando acessíveis ao reagente de Ellman.

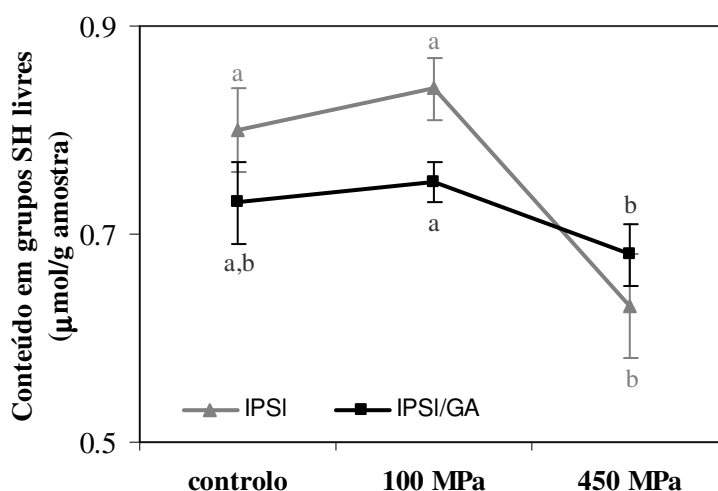


Figura 5.8 – Conteúdo em grupos SH livres de IPS_L e das misturas IPS_L/GA, controlo e processados por AP (50-450 MPa por 15 min) a pH 7. Letras diferentes (a-b) nas barras de erro indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre amostras (do mesmo tipo) processadas com diferentes valores de pressão.

Quando se analisa a alteração do conteúdo de grupos SH livres dos IPS laboratoriais por efeito da AP constata-se que tratamentos a 100 MPa não promoveram alterações significativas apesar da tendência para um ligeiro aumento de grupos SH livres, sugerindo a rutura das ligações S-S entre os agregados AB da glicinina por ação da pressão. O aumento da pressão para 450 MPa resultou na diminuição muito significativa do conteúdo em grupos SH livres, tal como se observou no IPS_c; contudo, nos isolados laboratoriais este decréscimo atingiu valores inferiores aos da amostra controlo, o que não se registou com o IPS_c. Estes resultados sugerem que, nos IPS laboratoriais, o estabelecimento de ligações S-S, induzido pelo tratamento a pressões mais elevadas, é mais acentuado do que no caso dos isolados comerciais. O efeito da adição da GA foi semelhante ao descrito para os isolados comerciais.

5.3.4 Efeito da alta pressão na distribuição de tamanhos dos constituintes do IPS_C e das misturas IPS_C/GA

A dispersão dinâmica de luz (DLS, *dynamic light scattering*) foi utilizada para determinar o grau de agregação resultante da aplicação da AP em IPS_C (Figura 5.9 A) e nas misturas IPS_C/GA (Figura 5.9 B) por estimativa da distribuição de tamanhos dos constituintes das amostras em estudo.

Com a aplicação de pressões de 50 e 100 MPa observou-se uma deslocalização progressiva do pico no sentido de menores dimensões possivelmente como resultado da rutura das interações hidrofóbicas existentes inicialmente nas amostras por efeito da pressão. A 100 MPa observaram-se dois picos, para valores de dimensões de partículas significativamente menores aos registados para o IPS controlo, indicando que os agregados existentes nas amostras foram parcialmente rompidos, dando origem a estruturas de dimensões inferiores. À pressão máxima aplicada (450 MPa) identificam-se 3 picos: dois deles correspondem a partículas de dimensões superiores às registadas a 100 MPa e podem corresponder a estruturas que resultaram de processos de agregação induzidos pelo tratamento a pressões mais elevadas e, um pico, ligeiramente inferior ao observado a 100 MPa, que poderá resultar de moléculas que foram desnaturadas e que não chegaram a sofrer agregação. O perfil a 300 MPa não é apresentado por ser intermédio ao do IPS_C processado a 450 MPa.

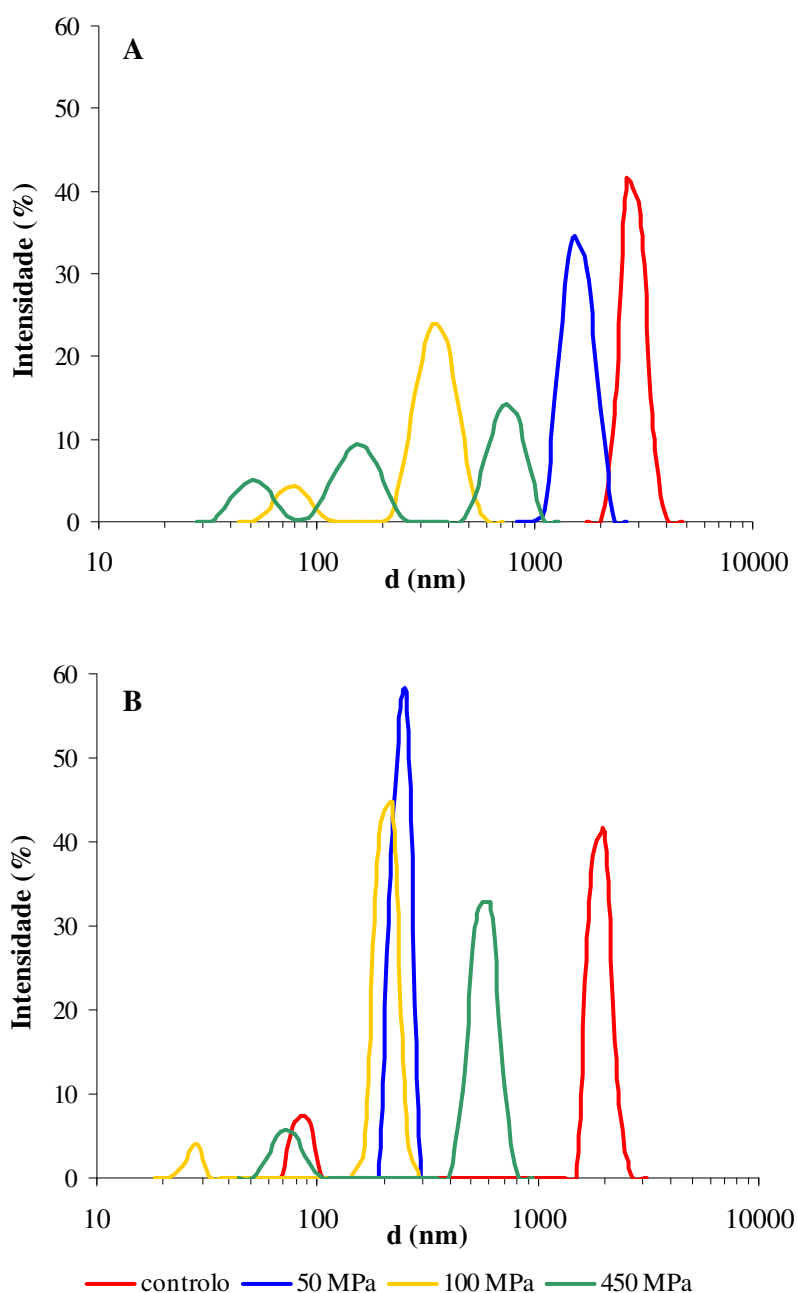


Figura 5.9 - Distribuição de tamanhos nas amostras de IPS_C (A) e nas misturas IPS_C/GA (B), controlo e processadas por AP (50, 100 e 450 MPa) a pH 7, 20 °C, a uma concentração de proteína de 0.5 mg/ml

No que se refere aos resultados obtidos para a mistura IPS_C/GA, constatou-se que a amostra controlo apresentou dois picos, um provavelmente correspondente à fração proteica que está agregada e, por isso, localizado na região de maiores dimensões, e outro,

correspondente à fração proteica que sofreu menor agregação em virtude da presença da GA. Saliente-se que o pico correspondente ao menor tamanho (Figura 5.9B) observado para a amostra sem tratamento confirma a hipótese de que o IPS_C ao ser liofilizado na presença da GA, sofre menos agregação do que no caso do IPS_C sem adição de polissacarídeo. A tendência para o aparecimento de picos correspondentes a menores dimensões foi visível para as amostras processadas a 50 e 100 MPa. Observam-se dois picos correspondentes às amostras IPS_C/GA processadas a 450 MPa, os quais localizam-se ligeiramente mais deslocados para zonas de menores dimensões relativamente aos picos das amostras de IPS sem GA.

5.3.5 Efeito da alta pressão na composição proteica da fração solúvel dos IPS e das misturas IPS/GA

O perfil electroforético das frações solúveis, em diferentes solventes, dos IPS e das misturas IPS/GA, controlo e processados por AP, em ambiente não redutor é apresentado na Figura 5.10 A (IPS comerciais) e 5.10 B (IPS laboratoriais).

Assim como observado no capítulo 2, a amostra controlo do IPS_C (Figura 5.10 A, linha 2) apresentou as bandas características correspondentes à globulina 7S: α' (89 kDa); α (81 kDa), β (51 kDa) e à globulina 11S: polipéptidos A (34 kDa) e B (21 kDa). A identificação das bandas foi feita por comparação das massas moleculares com a literatura (Molina *et al.*, 2001).

O perfil das proteínas solúveis em Tris/Gli mostrou que as bandas correspondentes às amostras processadas a 50 e 100 MPa (linha 3 e 4) apresentaram maior intensidade relativa das frações 7S e 11S, o que sugere que o tratamento a estes níveis de pressão permitiu uma maior solubilidade das amostras, provavelmente por efeito da pressão na dissociação dos agregados proteicos existentes nas amostras de IPS_C. Por outro lado, tal como na amostra controlo, o polipéptido B da globulina 11S está presente em pequena quantidade relativa nas amostras, o que sugere o envolvimento desta fração na formação de agregados, mesmo com o tratamento a estes níveis de pressão.

O aumento da pressão para 300 e 450 MPa resultou na diminuição da intensidade das bandas da linha 5 e 6, como resultado da menor solubilidade das amostras processadas

nesta gama de pressões. Não se registaram alterações nos perfis electroforéticos por efeito da adição da GA.

Comparando o perfil electroforético das frações solúveis dos dois tipos de isolados de soja, comercial e laboratorial, no solvente Tris/Gli constata-se a existência da subunidade AB (54 kDa) e maior intensidade de bandas no IPS_L, nomeadamente da banda correspondente à subunidade β da globulina 7S, o que é coerente com o facto deste isolado ter menor grau de agregação do que o IPS_C.

O efeito da AP sobre as frações solúveis do IPS_L em diferentes solventes é, de um modo geral, semelhante, ao observado para o IPS_C embora os efeitos promovidos pelos tratamentos a diferentes pressões sejam menos pronunciados no caso do IPS_L mostrando que o tratamento por AP tem maior influência na composição da fração solúvel das amostras proteicas com elevado grau de agregação.

Tal como no IPS_C, os perfis electroforéticos dos IPS_L, em Tris/Gli e em T/U-SDS/ureia, apresentaram uma banda de pequena intensidade correspondente ao polipéptido B da globulina 11S, traduzindo o seu envolvimento na formação de agregados de elevada massa molecular, insolúveis e estabelecidos por ligações S-S uma vez que a intensidade da banda deste polipéptido aumentou bastante no solvente T/U-SDS/Ureia/DTT.

Na presença de ureia-SDS ocorreu maior solubilização de todos os IPS_L, observando-se maior intensidade das bandas em todas as linhas. Contudo, este efeito foi mais acentuado para a amostra controlo e amostras processadas a 300 e 450 MPa, sugerindo que nestas amostras as interações hidrofóbicas e as pontes de hidrogénio têm maior contributo para a formação de agregados do que nas amostras processadas a 50 e a 100 MPa, para as quais o próprio tratamento por AP rompeu os agregados por clivagem das ligações de hidrogénio fracas e forças de van der Waals (Puppo *et al.*, 2004). Os agregados, formados por tratamento das amostras a 300 e 450 MPa, diminuem a solubilidade destas amostras em tampão Tris/Gli mas ao serem rompidos, com a adição de ureia-SDS, aumentam a solubilidade e consequentemente a intensidade das bandas. Estes resultados corroboram com os apresentados na Figura 5.4 e 5.5.

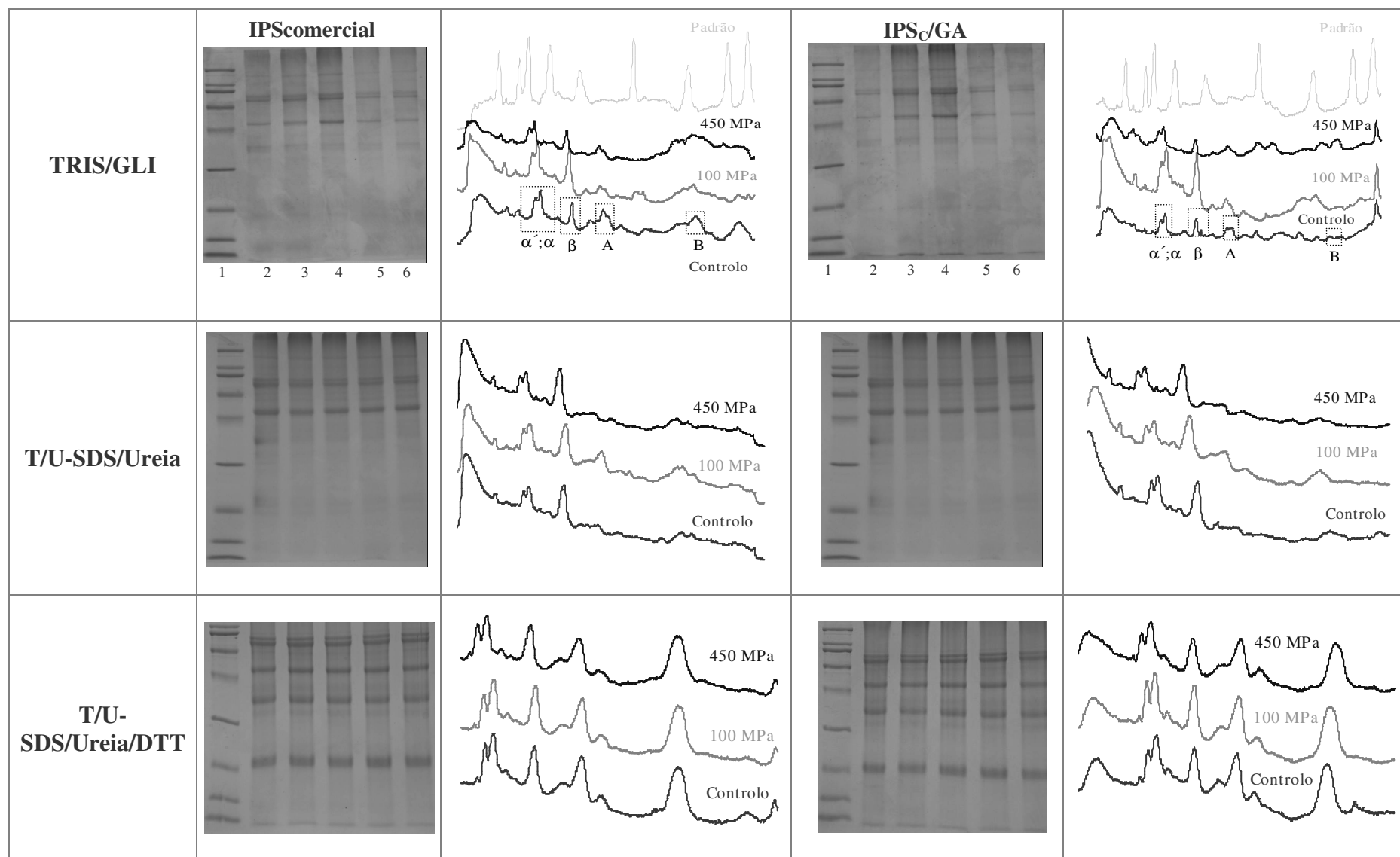


Figura 5.10 A – Eletroforeses SDS-Page, em ambiente não redutor, e respectivos electroferogramas das frações solúveis dos IPSc e misturas IPSc/GA comerciais, em diferentes solventes: Tris/Gli, T/U-SDS/Ureia e T/U-SDS/Ureia/DTT. Linha 1- padrões de massa molecular; linha 2- amostra controlo; linha 3- amostras processadas a 50 MPa; linha 4 – amostras processadas a 100 MPa; linha 5 – mostras processadas a 300 MPa e linha 6- amostras processadas a 450 MPa.

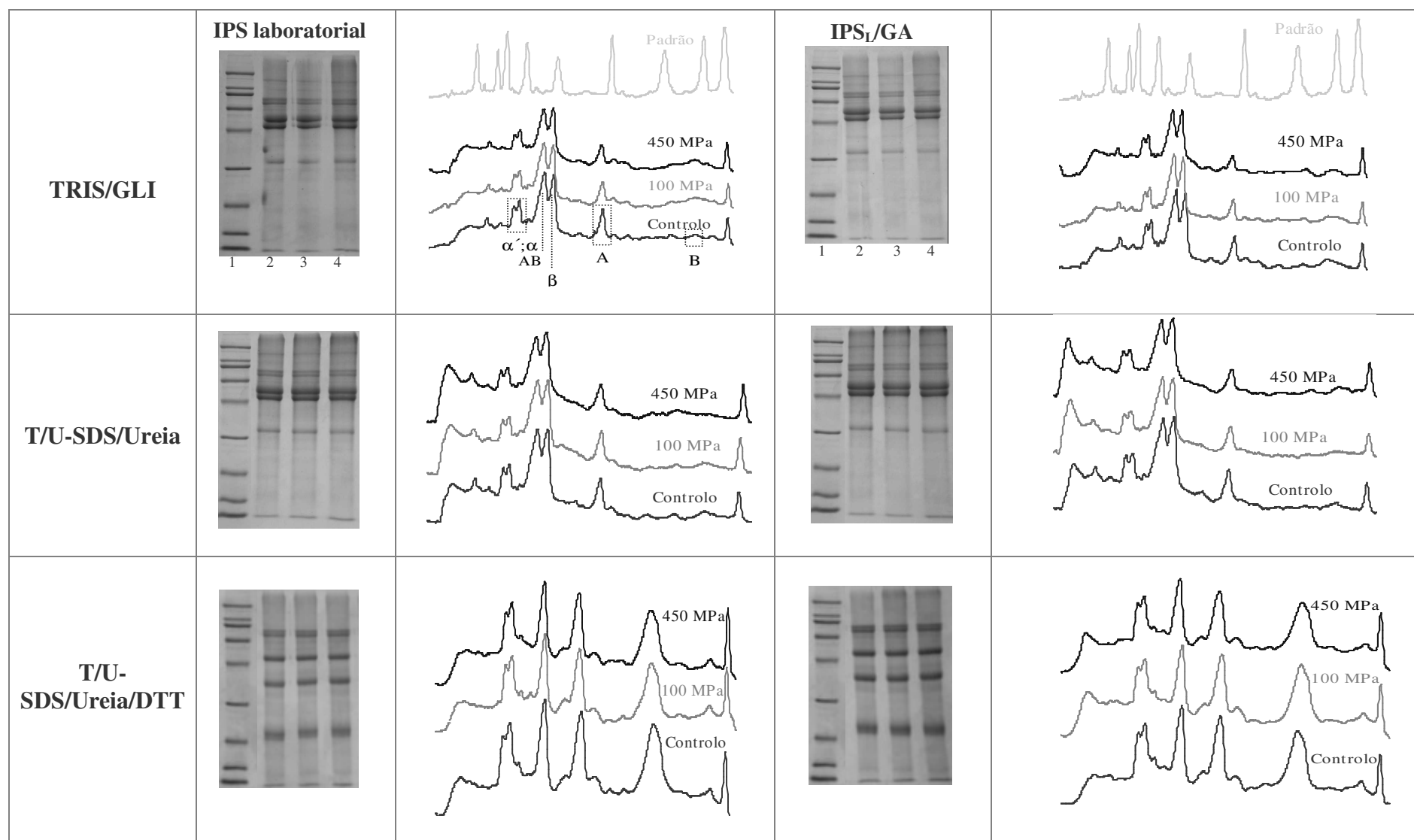


Figura 5.10 B – Eletroforeses SDS-Page, em ambiente não redutor, e respectivos electroferogramas das frações solúveis dos IPS_L e misturas IPS_L/GA laboratoriais, em diferentes solventes: Tris/Gli, T/U-SDS/Ureia e T/U-SDS/Ureia/DTT. Linha 1- padrões de massa molecular; linha 2- amostra controle; linha 3- amostras processadas a 100 MPa; linha 4 – amostras processadas a 450 MPa.

Observando o electroferograma do isolado processado a 100 MPa, na presença de ureia-SDS, observou-se um ligeiro aumento dos polipéptidos A e B da globulina 11S comparativamente com a correspondente amostra controlo, sugerindo que estas subunidades estariam envolvidas na formação de complexos na amostra do IPS_C inicial, rompidos posteriormente por tratamento com pressão. A 450 MPa, o electroferograma mostra um ligeiro aumento da subunidade β e uma diminuição do polipéptido A e em menor extensão do polipéptido B, demonstrando assim a ocorrência de rearranjos estruturais com o processamento por AP. Assim, pode-se inferir que o tratamento por AP, dependendo do valor de pressão aplicada, permite a rutura e/ou formação de agregados envolvendo subunidades diferentes, resultando assim em combinações variáveis.

Em meio de solubilização T/U-SDS/DTT, o perfil electroforético das frações solúveis foi semelhante independentemente do valor de pressão aplicada, observando-se um aumento generalizado da intensidade das bandas e o desaparecimento dos agregados proteicos de elevada massa molecular. No perfil electroforético das frações solúveis do IPS_L, em T/U-SDS/DTT desapareceu a banda correspondente aos agregados AB-11S, existente nas frações solúveis de Tris/Gli e em T/U-SDS e observou-se o aumento acentuado das bandas A e B da fração 11S para o IPS_L controlo e processado.

5.3.6 Efeito da AP na atividade emulsionante dos IPS e das misturas IPS/GA

De acordo com Kato *et al.* (1984) e Nakai (1983) a hidrofobicidade superficial e a solubilidade são os principais fatores determinantes da atividade emulsionante enquanto que a flexibilidade molecular das proteínas é importante para a estabilidade das emulsões. Contudo, alguma controvérsia sobre a relação entre solubilidade e atividade emulsionante é encontrada na literatura. Trabalhos desenvolvidos por Molina *et al.* (2001) não encontraram correlação entre estas duas propriedades. Por outro lado, verificaram que a 400 MPa o valor do IAE foi máximo embora a hidrofobicidade tenha atingido um valor mínimo. Os autores justificaram os resultados relacionando a dissociação da globulina 7S, trímero sem ligações S-S, com a atividade emulsionante e a agregação da globulina 11S, rica em ligações S-S, com o decréscimo da hidrofobicidade do IPS.

Os resultados apresentados na Figura 5.11 permitem constatar que o processamento por AP favoreceu as propriedades emulsionantes das proteínas de soja possivelmente por aumento da quantidade das proteínas adsorvidas na interface óleo/água, nomeadamente a subunidade β da β -conglucina e o polipéptido ácido da glicina (Puppo *et al.*, 2005). Valores de pressão até 300 MPa dos IPS_C promoveram o aumento significativo ($p < 0.05$) dos valores do IAE (Figura 5.11 A). Estes resultados sugerem que a dissociação dos agregados, inicialmente existentes nos isolados proteicos e a desnaturação parcial das proteínas pelo processamento por AP expuseram os grupos hidrofóbicos, promovendo a adsorção durante a formação da emulsão, diminuindo a tensão na interface óleo/água resultando no aumento da atividade emulsionante. Resultados semelhantes foram descritos por Wang *et al.* (2008) e Li *et al.* (2011) apesar de Molina *et al.* (2001) ter obtido valores máximos de IAE após tratamento a 400-600 MPa.

Por outro lado, a aplicação de valores de pressão superiores a 300 MPa não resultou em alterações significativas ($p < 0.05$) do IAE (Figura 5.11 A), tal como observado por Wang *et al.* (2008) embora se observe a tendência para o seu decréscimo, corroborando resultados de Li *et al.* (2011). Este resultado pode dever-se ao elevado grau de desnaturação da globulina 11S a 450 MPa que conduz, provavelmente, à agregação devido à oxidação dos grupos SH e formação de pontes dissulfureto (Galazka *et al.*, 1999) e consequente diminuição de solubilidade.

O efeito da AP sobre o IAE das misturas IPS_C/GA foi semelhante ao observado para o IPS_C. A presença do polissacarídeo teve um efeito positivo nos valores do IAE das misturas, aumentando-os, de forma significativa, comparativamente com os valores registados para o IPS_C, provavelmente por aumento da viscosidade da fase contínua. No entanto, o efeito da pressão sobre a atividade emulsionante das misturas IPS_C/GA foi menos pronunciado, tal como se verificou para outros parâmetros analisados (solubilidade, turbidez, conteúdo em grupos SH livres).

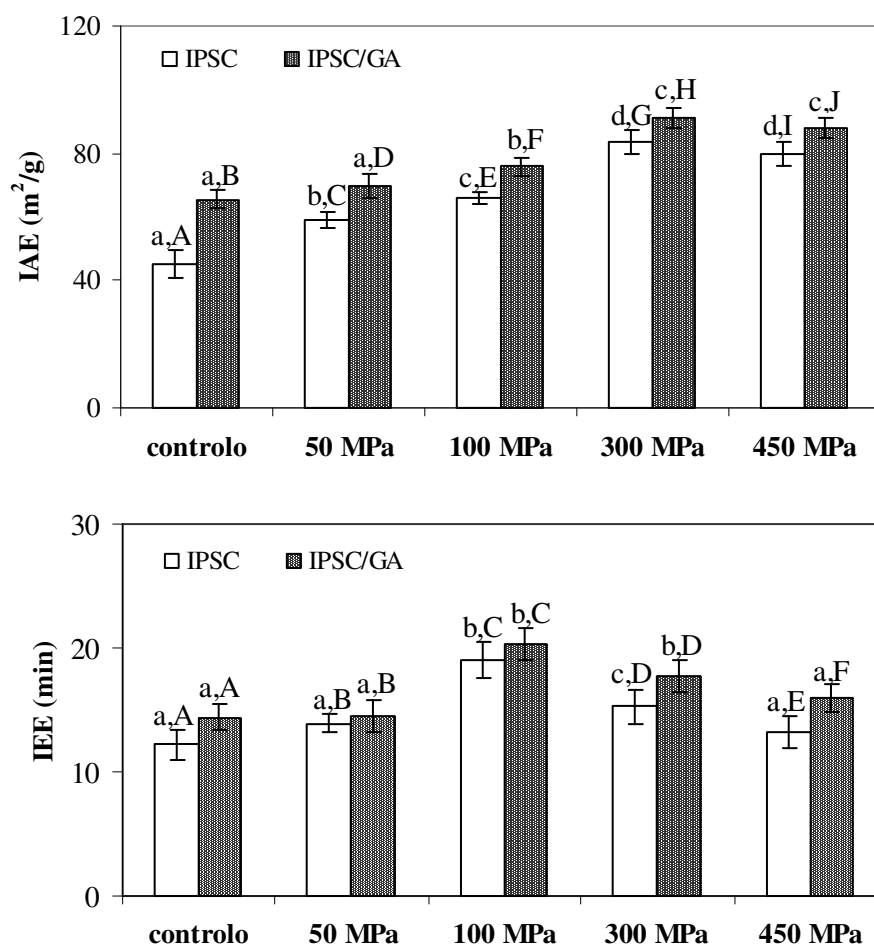


Figura 5.11 – Atividade emulsionante (A) e estabilidade da emulsão (B) dos IPS_C da mistura IPS_C/GA, controle e processadas por AP (50-450 MPa por 15 min) a pH 7. Os resultados correspondem a valores médios e desvios padrão de três réplicas. Letras minúsculas diferentes (a-d) nas barras de erro indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre amostras (do mesmo tipo) processadas com diferentes valores de pressão. Letras maiúsculas diferentes (A-J) indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre IPS e IPS/GA ao mesmo valor de pressão

Relativamente ao IEE, o processamento a 100 MPa resultou num aumento significativo ($p < 0.05$) do IEE. Amostras processadas a 300 e 450 MPa apresentaram valores de IEE inferiores aos registados a 100 MPa, registando-se a 450 MPa valores de IEE semelhantes aos obtidos para a amostra controle. Tendo em conta que o IEE se relaciona com a flexibilidade molecular da proteína, é possível inferir que a 100 MPa, a rutura dos agregados, provavelmente, aumentou a flexibilidade das proteínas e, com o progressivo aumento da pressão e consequente desnaturação seguida de agregação, a flexibilidade molecular volta a diminuir, refletindo-se nos valores de IEE a 300 e 450 MPa.

A adição da GA aumentou o IEE das misturas IPS_C/GA, em toda a gama de pressões estudadas, o que pode estar relacionado com o aumento da viscosidade da emulsão em virtude da presença do polissacarídeo. A existência de moléculas de polissacarídeo diminuiu o contacto físico entre as moléculas de proteína, diminuindo a agregação, o que possibilita maior flexibilidade proteica.

Quando se compara o IAE do IPS comercial (Figura 5.11 A) e laboratorial (Figura 5.12 A), sem tratamento, verifica-se que o IPS laboratorial tem maior atividade emulsionante do que o IPS comercial, o que poderá relacionar-se com o facto do IPS_L controlo estar menos agregado e possuir maior hidrofobicidade sendo, por isso, melhor emulsionante. Para o IPS obtido laboratorialmente, tratamentos a 100 MPa não exerceram efeito significativo no IAE; contudo, tratamentos mais severos (450 MPa) apresentam um efeito negativo. Galazka *et al.* (1995, 1996, 1999a) também constatarem o efeito negativo do processamento por AP na atividade emulsionante de diferentes preparados proteicos (lactoglobulina, concentrados de proteínas do soro do leite, proteínas de soja) tendo sido relacionado com a agregação proteica resultante do estabelecimento de pontes S-S envolvendo resíduos de cisteína da proteína.

A adição da GA provocou o decréscimo do IAE das misturas IPS_L/GA.

A Figura 5.12 B mostra que o tratamento por AP promoveu um aumento dos valores do IEE quer dos IPS_L quer das misturas. Contrariamente ao observado com o IPS_C, a adição da GA exerceu um efeito negativo, resultando na diminuição do IEE das misturas IPS_L/GA comparativamente ao IPS_L, para todas as condições de tratamento analisadas.

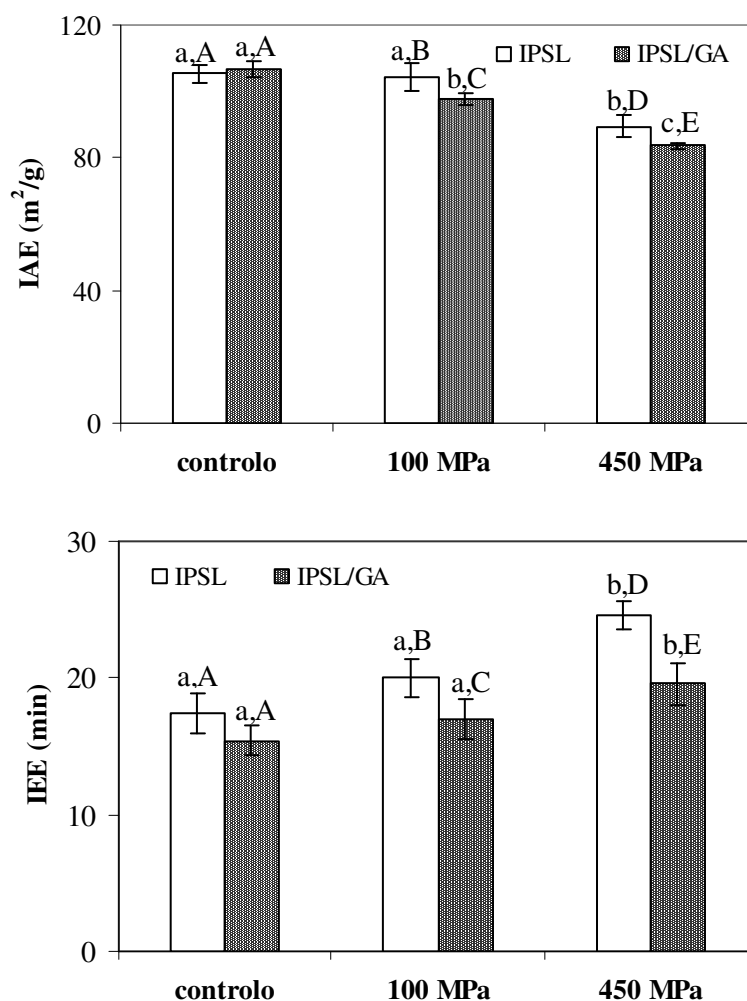


Figura 5.12 – Atividade emulsionante (A) e estabilidade da emulsão (B) dos IPS_L e da mistura IPS_L/GA, controle e processadas por AP (a 100 e 450 MPa por 15 min) a pH 7. Os resultados correspondem a valores médios e desvios padrão de três réplicas. Letras minúsculas diferentes (a-c) nas barras de erro indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre amostras (do mesmo tipo) processadas com diferentes valores de pressão. Letras maiúsculas diferentes (A-E) indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre IPS e IPS/GA ao mesmo valor de pressão

5.3.7 Efeito da AP na capacidade gelificante dos IPS e das misturas IPS/GA

A Figura 5.13 mostra a evolução do módulo de armazenamento (G') e do módulo de perda (G'') das dispersões a 10 % (m/v) do IPS_C e das misturas IPS_C/GA (10 %/0.5 % (m/v)), com e sem processamento por AP, quando sujeitas a aquecimento de 40 °C a 95 °C, a uma taxa de 1 °C/min.

A evolução dos módulos viscoelásticos do IPS_C controle não corresponde ao perfil típico de gelificação descrito para proteínas: No início do ciclo de aquecimento G' e G'' apresentaram valores consideravelmente elevados e G' foi superior a G'' , revelando a

existência de pré-agregação das moléculas proteicas. Com o progressivo aumento da temperatura observou-se um ligeiro aumento de G' mas a partir dos 70 °C, os módulos viscoelásticos diminuíram com o aumento da temperatura sugerindo a rutura da estrutura previamente existente causando o decréscimo de G' .

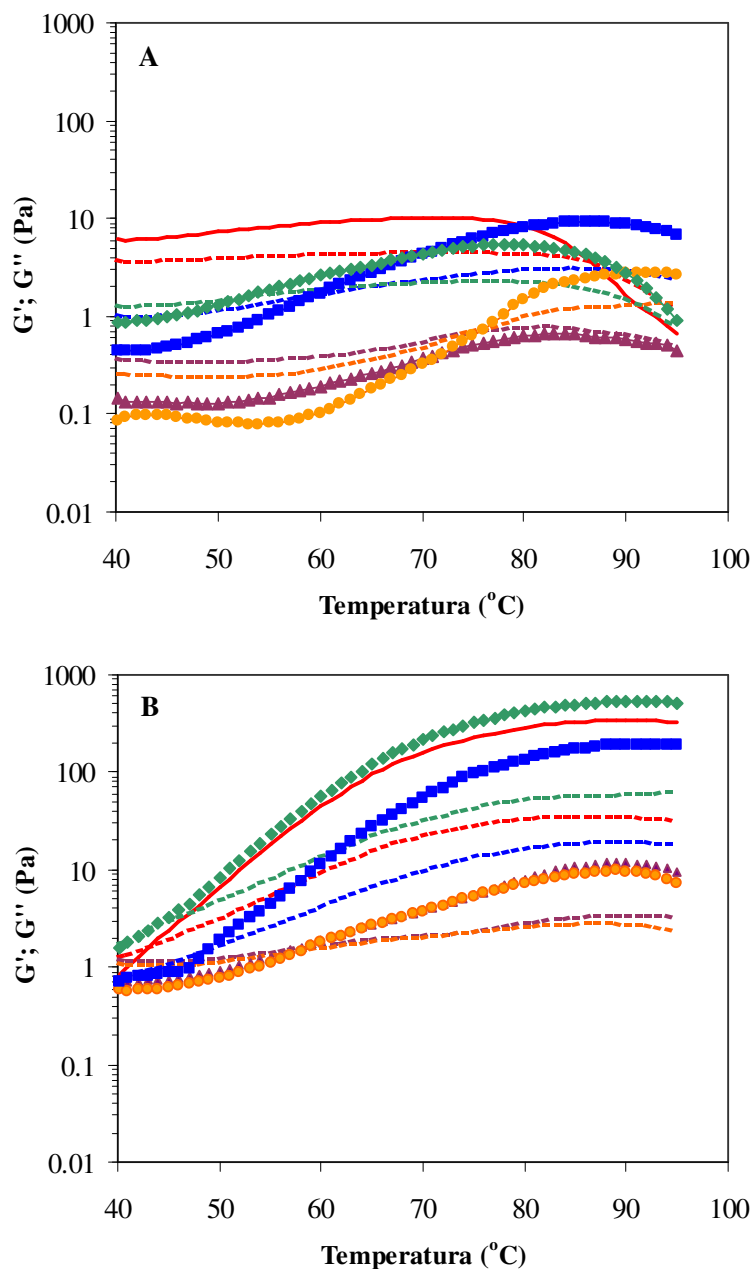


Figura 5.13 – Variação do módulo de armazenamento (símbolos fechados, linha a cheio) e do módulo de perda (linhas tracejadas) com a temperatura (1 °C/min), de dispersões de IPS_C a 10% (A) e de misturas IPS_C 10%/GA 0.5% (B), não processadas (linhas vermelhas) e processadas por AP com diferentes pressurizações: 50 MPa (▲,△); 100 MPa (●,○); 300 MPa (■,□) e 450 MPa (◆,◇).

A 86 °C, G'' passou a ser superior a G' e no final do ensaio, a 95 °C, os módulos apresentaram valores inferiores aos registados a 40 °C. Os perfis de dependência dos módulos viscoelásticos com a temperatura das dispersões de IPS_C processadas a 50, 100 e 300 MPa foram qualitativamente semelhantes entre si e típicos da gelificação de proteínas globulares induzida por aquecimento. A 40 °C, os valores dos módulos viscoelásticos das dispersões submetidas a 50 e a 100 MPa diminuíram cerca de duas ordens de grandeza comparativamente com a amostra controlo, o que poderá relacionar-se com os resultados anteriormente apresentados e discutidos. A aplicação desta gama de pressões promoveu a rutura das ligações responsáveis pela agregação inicialmente existente nas amostras de IPS comercial, resultando em dispersões com maior carácter líquido ($G'' > G'$) e com valores de módulos menores. A 100 MPa, os efeitos são mais acentuados do que a 50 MPa. Contudo, a 50 MPa, G'' foi sempre superior a G' enquanto que a 100 MPa, a temperatura de cruzamento dos módulos, considerada como a temperatura de gelificação, T_{gel} , foi de 76 °C, valor muito próximo da temperatura de desnaturação da β -conglucina (74 °C) (Arrese *et al.*, 1991).

As dispersões processadas a 300 MPa apresentaram módulos viscoelásticos inferiores à amostra controlo mas superiores aos observados para as amostras processadas a 50 e 100 MPa, provavelmente porque o aumento da pressão levou ao aumento da desnaturação e subsequente reassociação das proteínas desnaturadas. Este efeito refletiu-se, consequentemente, na diminuição da temperatura de gelificação, que passou de 76 para 60 °C, com o aumento de pressurização de 100 para 300 MPa. Assim, o processo de formação do gel iniciou-se a uma temperatura inferior à T_d da β -conglucina refletindo uma desnaturação prévia das proteínas constituintes do IPS_C induzida pelo processamento a 300 MPa.

O aumento da pressão aplicada de 300 para 450 MPa resultou numa alteração do perfil de gelificação, verificando-se uma tendência para o comportamento descrito para a amostra controlo. Conclui-se assim que o tratamento a 450 MPa fomenta o aumento de interações entre cadeias polipeptídicas, resultando num aumento considerável do grau de agregação, o que poderá explicar a semelhança de comportamento com a amostra controlo. Contudo, a 40 °C, G'' foi superior a G' embora rapidamente G' se tenha tornado superior. Até aos 78 °C registou-se um progressivo aumento dos módulos viscoelásticos, mas a partir desta temperatura G' decresceu acentuadamente embora sempre superior a G'' . Observações semelhantes foram descritas por Speroni *et al.*

(2010) mas para amostras processadas a 200 e 400 MPa. Estas interações entre cadeias proteicas deverão ser predominantemente de natureza entálpica, nomeadamente, ligações de hidrogénio, cuja estabilidade diminui com o aumento da temperatura e a sua rutura deverá ser a causa para a diminuição do valor de G' . Esta hipótese é corroborada pelo trabalho de Boonyaratankornkit *et al.* (2002), em que se comprovou que a AP promoveu a formação de ligações de hidrogénio.

A adição prévia da GA ao IPS_C resultou num aumento dos módulos viscoelásticos durante o aquecimento das dispersões, para todas as amostras em análise. Por outro lado, a presença do polissacarídeo mostrou ser o fator determinante para o valor inicial dos módulos antes do tratamento térmico e não o efeito do processamento por pressão, uma vez que todas as misturas apresentam valores semelhantes ($\cong 1$ Pa). Por outro lado, constatou-se que G' e G'' apresentaram valores próximos mostrando que a influência do processamento não é relevante para as propriedades viscoelásticas iniciais das misturas. Contudo, à medida que a temperatura aumentou a influência da pressurização das misturas IPS_C/GA começou a ser notória. De um modo geral, o aumento da temperatura resultou num gradual aumento dos módulos viscoelásticos para todas as amostras, controlo e processadas. As misturas processadas a 50 e a 100 MPa apresentaram valores de módulos, a 95 °C, menores mas em ambos os casos G' foi superior a G'' . O aumento da pressão aplicada às misturas resultou no progressivo aumento de G' verificando-se que a mistura processada a 450 MPa atingiu valores de G' e G'' superiores aos atingidos pela mistura controlo. Pelos resultados previamente discutidos, concluiu-se que a GA exibiu um efeito baroprotector e, por isso, os efeitos do processamento da AP sobre as proteínas do IPS_C foram menos intensas na presença da GA. Assim, a 50 e a 100 MPa os agregados inicialmente existentes não foram, na sua maioria, dissociados por ação da AP e, daí observar-se um ligeiro decréscimo de G' para valores de temperatura de aproximadamente 90 °C, resultante da rutura de pontes de hidrogénio cuja estabilidade decresce com o incremento da temperatura. Por outro lado, o processamento a 300 e 450 MPa resultou numa gradual desnaturação e subsequente agregação embora não tão intensa como no caso do IPS_C sem GA.

Durante o arrefecimento do sistema de 95 a 20 °C, G' e G'' de todas as amostras, IPS_C e das misturas, aumentaram monotonamente com o decréscimo da temperatura, o que se traduz num aumento da rigidez do gel. Resultados similares são descritos na literatura e

revelam o fortalecimento das interações não covalentes, em grande medida, pontes de hidrogénio, entre as partículas que constituem a rede tridimensional.

Após arrefecimento até 20 °C, o efeito da AP no comportamento viscoelástico do gel formado foi analisado por observação dos ensaios oscilatórios de varrimento em frequência. A Figura 5.14 apresenta os espectros mecânicos (A,B) e respectivas tangentes ao ângulo de perda (C e D) obtidos para os géis dos IPS_C (A, C) a 10 % e das misturas IPS_C 10 %/GA 0.5 % (B, D), submetidas a diferentes pressurizações.

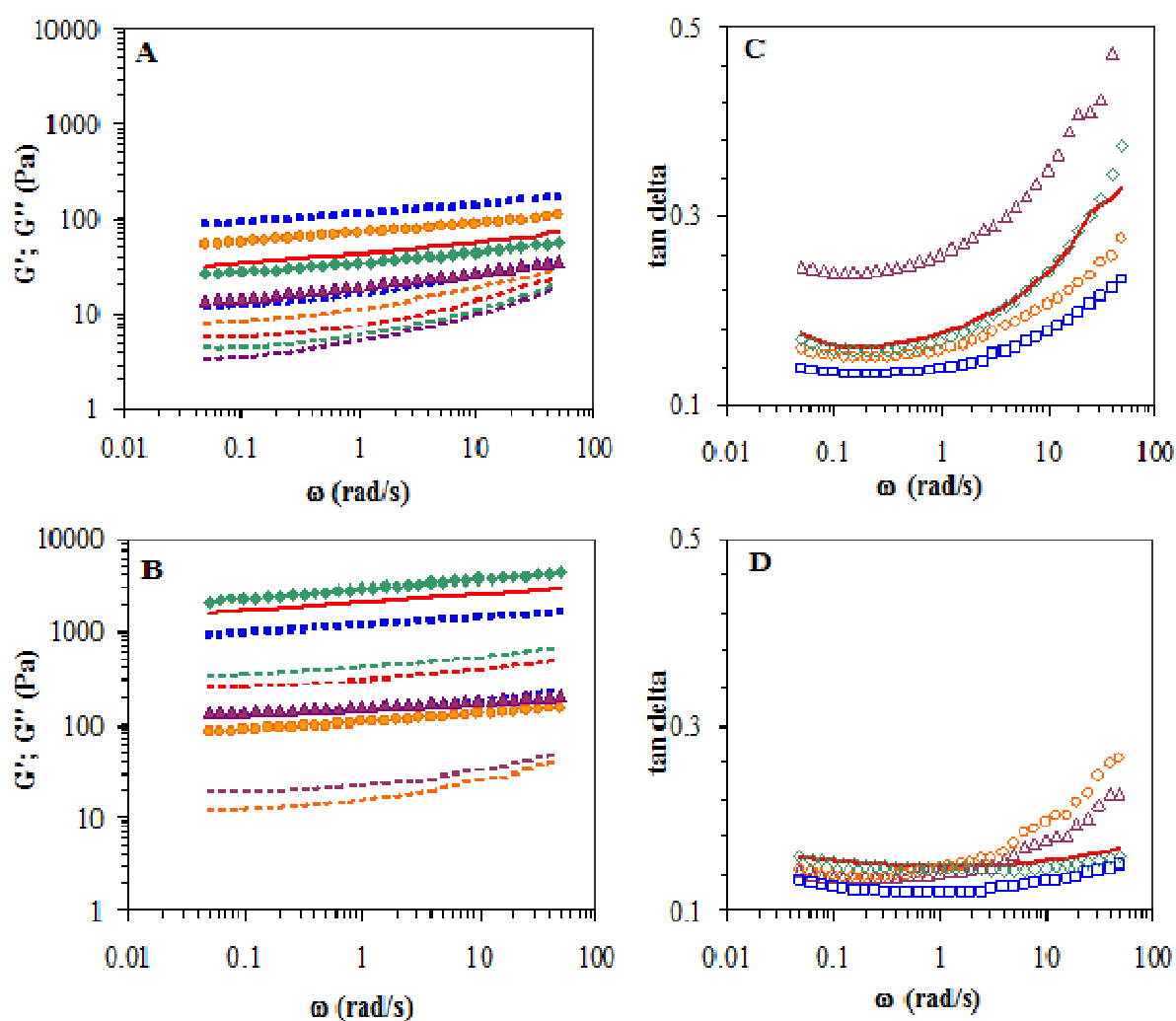


Figura 5.14 – Espectros mecânicos (A, B) e respectivas tangentes ao ângulo de perda (C, D) de IPS_C (A, C) a 10% e de misturas IPS_C10%/GA 0.5% (B, D), não processadas (linhas a vermelho) e processadas por AP com diferentes pressurizações: 50 MPa (▲,△); 100 MPa (●,○); 300 MPa (■,□) e 450 MPa (◆,◇). Símbolos fechados: G' e linhas tracejadas: G'' .

Todos os espectros apresentaram um comportamento viscoelástico qualitativamente semelhante, típico de gel físico, com G' superior a G'' em, aproximadamente, uma década de diferença, traduzindo-se em valores de $\tan \delta$ menores que 1. Para além disso, observa-se em toda a gama de frequências estudada, considerável dependência dos módulos viscoelásticos face à frequência de oscilação, sendo esta maior nos sistemas contendo apenas IPS_C ($G' \propto \omega^{0.09-0.15}$) do que nas misturas IPS_C/GA ($G' \propto \omega^{0.06-0.10}$).

As amostras de IPS_C processadas a 50 e a 450 MPa exibiram módulos viscoelásticos inferiores à amostra controlo, em toda a gama de frequências estudada (Fig. 5.14 A) sugerindo que o processamento a estes valores de pressão, previamente ao tratamento térmico, interfere com a capacidade das proteínas de soja estabelecerem ligações intermoleculares, as quais são fundamentais para a gelificação induzida termicamente.

Os resultados sugerem que o gel obtido a partir do IPS_C processado a 50 MPa apresentou maior caráter viscoso (maior valor de $\tan \delta$) enquanto que o tratamento por AP a 300 MPa originou géis mais fortes com predominância de caráter elástico.

Com a adição da GA observou-se um aumento significativo dos módulos viscoelásticos de todos os géis em análise e uma ligeira diminuição dos valores de $\tan \delta$ (Fig. 5.14 D), obtendo-se géis mais elásticos e fortes. Tendo em conta o efeito baroprotector da GA, pode-se concluir que nos sistemas mistos a proteína sofreu maior efeito do tratamento térmico originando géis mais fortes e elásticos. Assim, valores de pressão mais elevados favoreceram o estabelecimento de interações que não contribuíram positivamente para a formação do gel. Este efeito foi minimizado por adição da GA.

Os resultados obtidos permitem inferir que o efeito da AP é favorável à gelificação quando as condições de processamento originam amostras menos agregadas e/ou mais desnaturadas. Contudo, os tratamentos por AP que resultam em amostras mais agregadas originam géis menos rígidos e elásticos. O efeito da natureza das interações bem como o local de estabelecimento dessas ligações foi já apontado como possível causa para justificar diferentes efeitos da pressão nas propriedades viscoelásticas de amostras de soja (Speroni *et al.*, 2009).

Quando se analisa o perfil de evolução dos módulos viscoelásticos do IPS laboratorial e das suas misturas com a GA (Figura 5.15), observou-se que a amostra processada a 100

MPa apresentou um perfil de gelificação semelhante ao da amostra controlo, inicialmente com G'' superior a G' , embora a diferença entre os dois módulos seja maior na amostra tratada a 100 MPa. Por outro lado, a temperatura de cruzamento entre G' e G'' (T_{gel}) ronda os 81 °C, temperatura próxima à temperatura de desnaturação da glicinina (Arrese *et al.*, 1991). Os valores das T_{gel} do IPS_C e do IPS_L relacionaram-se com o grau de desnaturação dos isolados resultante da origem do isolado e do método de extração.

O IPS_L processado a 450 MPa apresentou módulos viscoelásticos iniciais bastante mais elevados do que o IPS_L controlo, como resultado da natureza mais agregada desta amostra. Contudo, a 95 °C, os valores atingidos foram inferiores o que sugere que o processamento a pressões moderadas (450 MPa) promoveu alterações que foram prejudiciais à gelificação induzida termicamente. O aumento da pressão aplicada resultou na diminuição da T_{gel} como resultado da desnaturação promovida pela AP.

A adição da GA promoveu, tal como no IPS_C, o aumento dos módulos viscoelásticos e uma ligeira diminuição da T_{gel} , mais pronunciada na amostra controlo ($T_{gel}^{controlo}IPS_L = 81$ °C; $T_{gel}^{controlo}IPS_L/GA = 74$ °C) e menos sentida na amostra tratada a 450 MPa ($T_{gel}^{450MPa}IPS_L = 56$ °C; $T_{gel}^{450MPa}IPS_L/GA = 54$ °C) demonstrando-se, mais uma vez, que os efeitos dos tratamentos a pressões mais elevadas sobrepõem-se ao efeito da adição da GA. O efeito da pressão no perfil de gelificação das misturas IPS_L/GA foi semelhante ao do IPS_L.

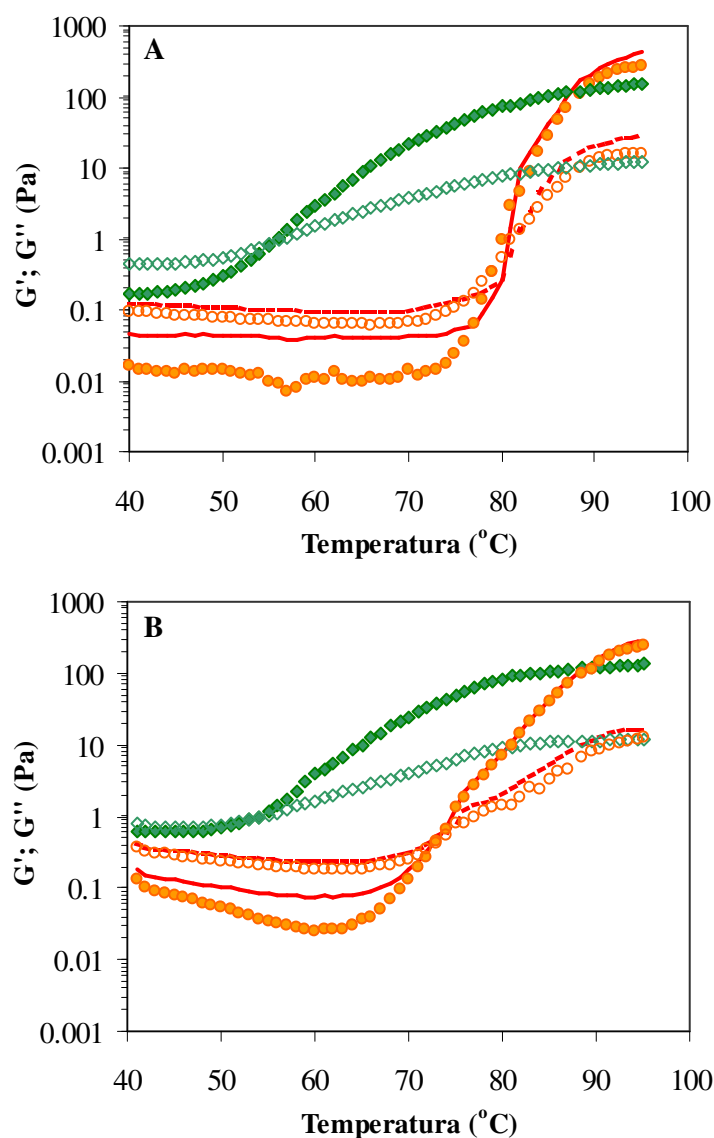


Figura 5.15 – Variação do módulo de armazenamento (símbolos fechados e linha a cheio) e do módulo de perda (símbolos abertos e linha tracejada) com a temperatura (1 °C/min), de dispersões de IPS_L a 10% (A) e de misturas IPS_L 10%/GA 0.5% (B), não processadas (linhas) e processadas por AP com diferentes pressurizações (símbolos): 100 MPa (●,○) e 450 MPa (◆,◇).

Os espectros mecânicos a 20 °C (Figura 5.16), revelaram um comportamento tipo gel em todos os casos. Uma ligeira diminuição de G' , ao longo de toda a gama de frequências analisada, foi observada nas amostras tratadas por AP comparativamente com a amostra controle. A presença de GA aumentou ligeiramente os módulos viscoelásticos mas em menor intensidade do que no caso do IPS_C.

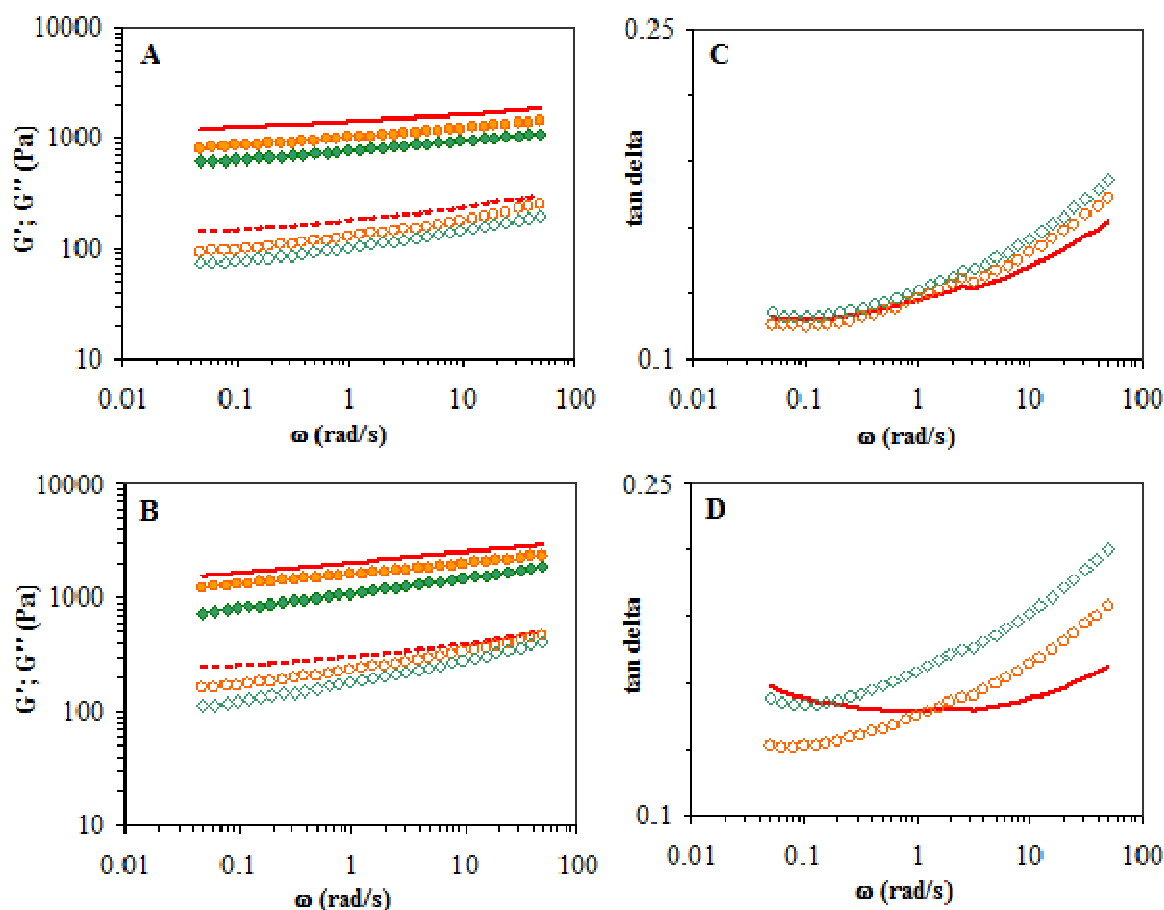


Figura 5.16 – Espectros mecânicos (A, B) e respectivas tangentes ao ângulo de perda (C, D) de IPS_L (A, C) a 10% e de misturas IPS_L10 %/GA 0.5% (B, D), não processadas (linhas a vermelho) e processadas por AP com diferentes pressurizações: 100 MPa (●,○) e 450 MPa (◆,◇). Símbolos fechados: G' e símbolos abertos: G'' .

5.3.8 Efeito da AP nas propriedades estruturais dos IPS e das misturas IPS/GA

De forma a investigar o efeito do processamento por AP na agregação e na estrutura secundária das proteínas dos IPS e das misturas IPS/GA foram obtidos espectros de FT-IR na região 4000–600 cm^{-1} , sendo a região amida I, compreendida entre, 1700–1600 cm^{-1} , a região espectral estudada pois é a mais importante para o estudo das propriedades estruturais das proteínas.

As bandas originadas pelos diferentes elementos constituintes da estrutura secundária sobrepõem-se, tornando-se necessário separá-los (Surewicz e Mantsch, 1988). Para o efeito, neste estudo foi aplicado o processo de desconvulsão sugerido por outros autores (Byler e Susi, 1986; Lefèvre e Subirade, 2001; Alvarez *et al.*, 2008; Tang e Ma, 2009).

A Figura 5.17 apresenta um espectro da região amida I da amostra IPS_C controlo, após desconvulsão. Dez bandas associadas à conformação das proteínas foram distintamente observadas na região amida I da curva desconvoluída, indicando que a estrutura secundária dos IPS foi bastante complexa devido à diversidade de componentes proteicos constituintes dos isolados.

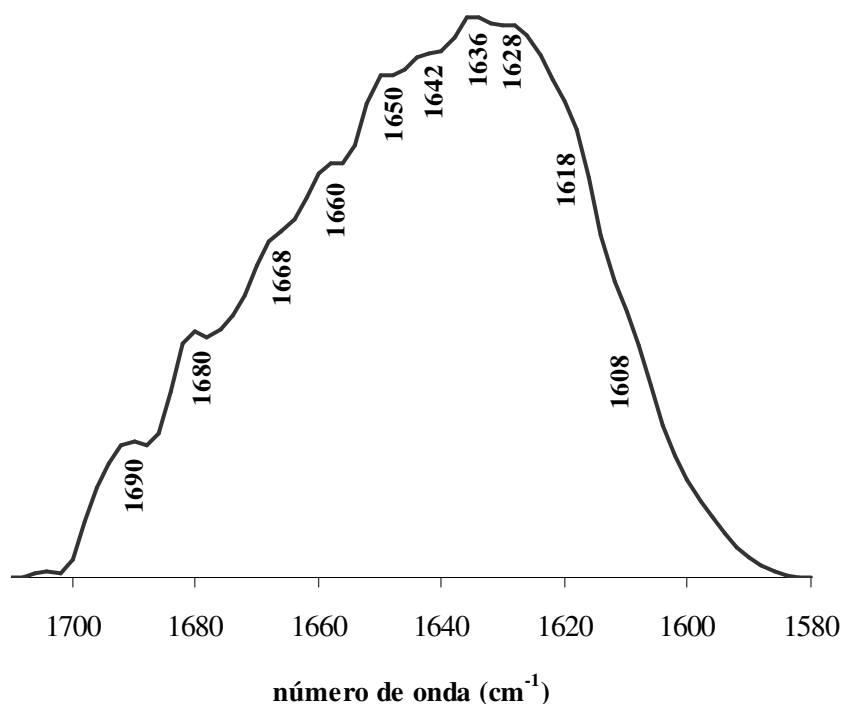


Figura 5.17 – Região amida I desconvoluída do espectro de FT-IR do IPS_C

Estas bandas, principalmente atribuídas à vibração C=O stretching e à vibração C-N stretching das ligações peptídicas, refletem a estrutura secundária das proteínas (Byler e Susi, 1986; Tang e Ma, 2009). Baseado em trabalhos anteriormente publicados (Okuno *et al.*, 2006; Alvarez *et al.*, 2008; Tang e Ma, 2009), estas bandas foram atribuídas da seguinte forma: A banda a 1692 cm⁻¹, voltas e curvas β (*β -type turn and bend*); a 1668 e 1660 cm⁻¹, voltas β (*β -turns*); 1650 cm⁻¹, α -hélice; a 1642 cm⁻¹, estruturas desordenadas (*random coils*); a 1636 cm⁻¹, estrutura em folha β antiparalela. A banda localizada a 1628 cm⁻¹ está associada a β -strands fortemente ligadas (Lefèvre e Subirade, 2000) e β -strands distorcidas. Esta banda é também indicativa de estruturas tipo folhas β intermoleculares (Allain, Paquin e Subirade, 1999). As duas bandas situadas a 1680 e 1618 cm⁻¹ (designadas bandas de agregação) são frequentemente associadas a processos de agregação entre componentes das proteínas. A primeira está

associada a folhas β intermoleculares resultantes da agregação enquanto a segunda, indica que as folhas β são antiparalelas (Lefèvre e Subirade, 2000).

A Figura 5.18 A mostra a região amida I desconvoluída das amostras IPS_C controlo e processadas a 100 e 450 MPa. Os espetros das amostras tratadas a 50 e 300 MPa (não apresentados) foram intermédios aos espetros das amostras a 100 e 450 MPa, respetivamente.

Como esperado, o processamento por AP resultou em alterações de intensidade e de número de onda de algumas das bandas da região amida I. O tratamento a 100 MPa originou uma diminuição de intensidade das bandas situadas a 1692 e 1668 cm⁻¹ relacionadas com a diminuição de estruturas β , respetivamente, voltas e curvas β e β -*strands* e uma significativa diminuição das bandas a 1680, 1618 cm⁻¹ atribuídas a processos de agregação. Por outro lado, observou-se um aumento de intensidade da banda a 1644 cm⁻¹, indicando um aumento do conteúdo de estruturas desordenadas. A banda localizada a 1632 cm⁻¹, atribuída a estruturas em folha β antiparalela aumentou de intensidade sugerindo um aumento no conteúdo de ligações de hidrogénio nas estruturas em folha β que inicialmente estavam voltados para o interior das moléculas, o que constitui uma indicação indireta do desdobramento da estrutura proteica induzido pela AP.

Após tratamento a pressões superiores (450 MPa), registou-se um aumento significativo na intensidade da banda a 1680 cm⁻¹, indicando um aumento substancial de agregação nas amostras, acompanhado do aumento das bandas a 1668 e 1660 cm⁻¹, atribuídas a voltas (*turns*) e curvas (*bends*) (Byler e Susi, 1986). Estas alterações foram acompanhadas por uma diminuição da banda a 1644 cm⁻¹ comparativamente às amostras com processamento inferior a 450 MPa, indicando a diminuição do conteúdo em estruturas desordenadas. Estas alterações evidenciam que após processamento a 450 MPa, as proteínas desnaturadas sofreram processos de reassociação das estruturas secundária.

Na presença da GA, as alterações foram semelhantes embora os efeitos promovidos pela AP menos pronunciados (Figura 5.18 B).

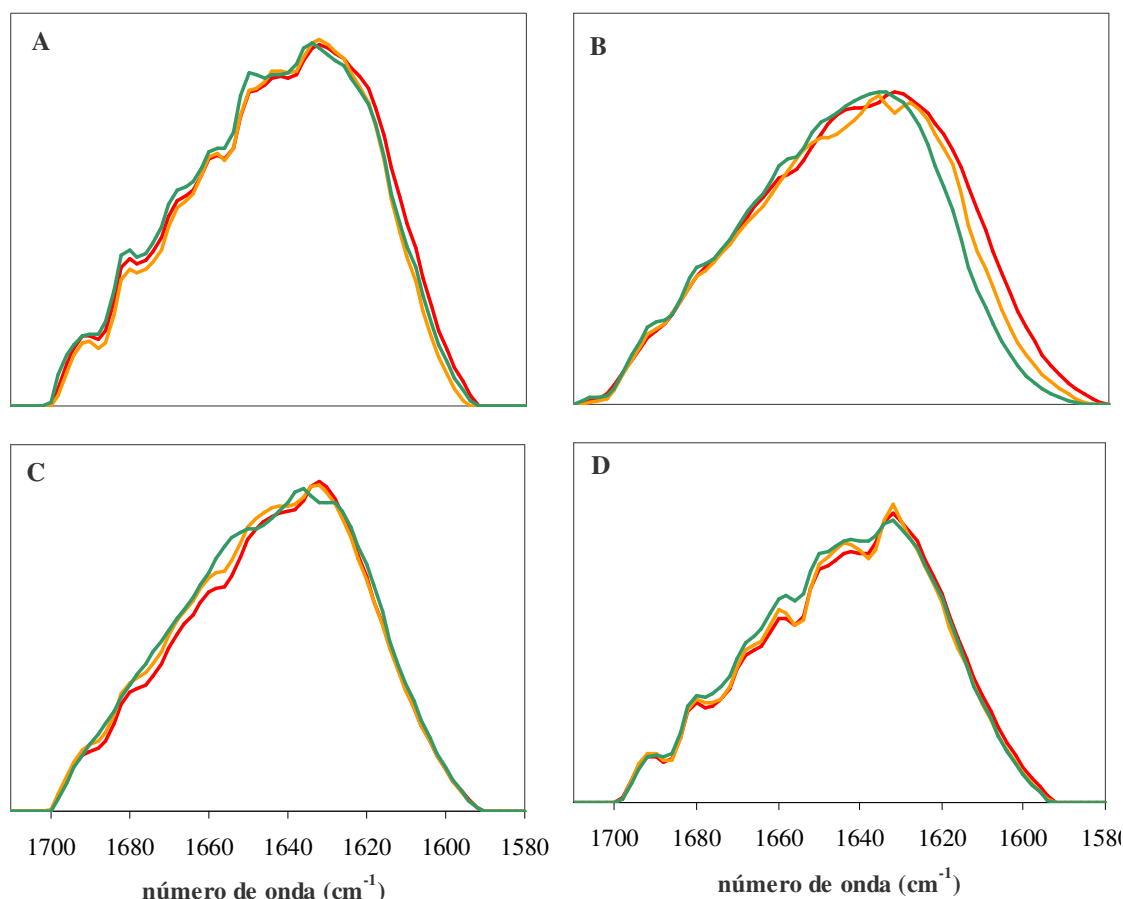


Figura 5.18 - Região amida I desconvoluída dos espectros de FT-IR dos IPS (A,C) e das misturas IPS/GA (B, D), amostras comerciais (A,B) e obtidas laboratorialmente (C,D). Linha vermelha: amostras controle; linha laranja: amostras processadas a 100 MPa e linha verde: amostras processadas a 450 MPa

Quando se analisa o efeito da AP nas propriedades estruturais das proteínas dos isolados de soja obtidos laboratorialmente (Figura 5.18 C) observam-se algumas alterações diferentes das registradas para as amostras de soja comercial. O processamento a 100 MPa promoveu o aumento da intensidade da banda a 1680 cm^{-1} , indicando um aumento substancial de folhas β intermoleculares resultantes de processos de agregação nas amostras, acompanhado do aumento das bandas a 1668 e 1660 cm^{-1} , atribuídas a voltas e curvas (Byler e Susi, 1986). Por outro lado, o aumento da pressão aplicada, não aumentou a intensidade da banda de agregação a 1680 cm^{-1} embora se observe um ligeiro aumento de intensidade a 1618 cm^{-1} . A região do espectro, entre 1700 e 1660 cm^{-1} , das misturas IPS_L/GA processadas a 100 MPa foi semelhante à região do espectro da amostra controle. Com o aumento da pressão para 450 MPa, registou-se um ligeiro deslocamento, cerca de 2 cm^{-1} , na maioria das bandas da amida I, evidenciando a

conformação mais desnaturada das amostras processadas por AP em relação à amostra controle.

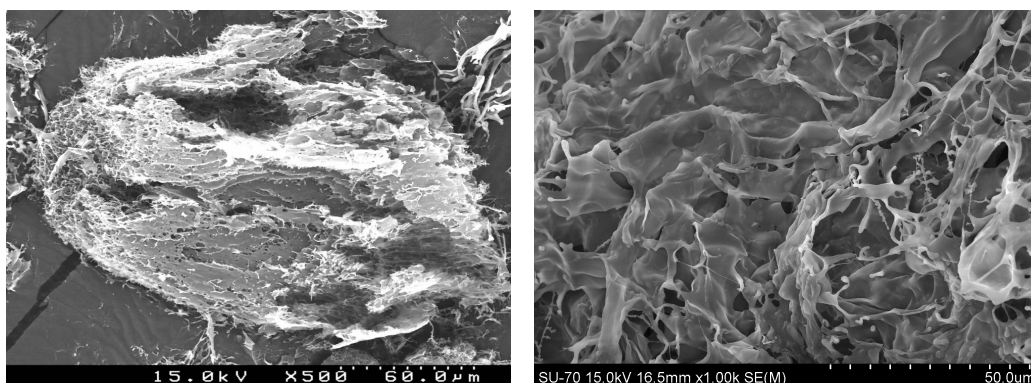
Os resultados obtidos permitem inferir que a pressão exerceu maior efeito sobre as amostras de IPS comercial resultando em alterações mais pronunciadas da estrutura secundária das proteínas constituintes dos isolados proteicos e que a presença da GA atenuou os efeitos promovidos pela AP. Desta forma, as alterações conformacionais sofridas por ação da AP ajudam a confirmar os resultados anteriormente apresentados.

5.3.9 Efeito da AP na microestrutura dos IPS e das misturas IPS/GA

Na Figura 5.19 é possível observar a microestrutura das amostras de IPS comercial e laboratorial. Quer o IPS comercial quer o obtido laboratorialmente apresentaram uma conformação plana e bastante característica dos produtos liofilizados. O IPS comercial parece ter uma estrutura mais compacta do que o IPS obtido laboratorialmente. Por outro lado, embora a conformação predominante do IPS laboratorial seja plana observa-se a existência de estruturas globulares, as quais são pouco visíveis no IPS comercial.

A Figura 5.20 apresenta a microestrutura do IPS comercial e respectivas misturas com GA, processadas a 100 e 450 MPa. O processamento por AP afetou significativamente a microestrutura dos isolados. A amostra de IPS comercial tratada a 100 MPa apresentou uma significativa diferença de aparência do IPS sem tratamento por AP, evidenciando uma estrutura menos compacta e mais filamentar. Contrariamente à amostra controle, na microestrutura do IPS submetido a 100 MPa observaram-se pequenas estruturas globulares semelhantes às existentes no IPS laboratorial. O aumento da pressão aplicada (450 MPa) promoveu a alteração da microestrutura do IPS_C observando-se uma conformação mais plana e compacta, mais próxima da microestrutura da amostra controle.

IPS comercial



IPS laboratorial

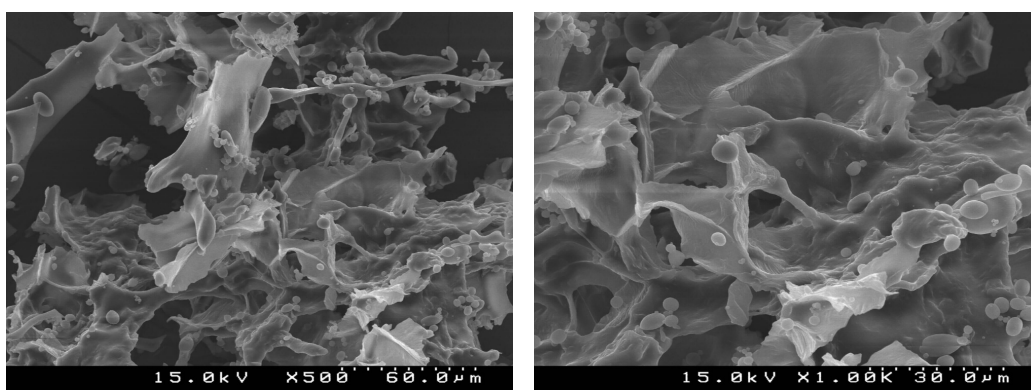


Figura 5.19 – Imagens de MEV dos IPS, comercial e obtido laboratorialmente, sem tratamento por AP. Ampliações de 500 e 1000 vezes.

Embora não haja uma relação direta entre microestrutura e características físico-químicas, estes resultados de MEV estão particularmente coerentes com os resultados discutidos anteriormente.

De forma a avaliar o efeito da AP na microestrutura dos IPS comercial quando pressurizados na presença de GA, obtiveram-se imagens de MEV das amostras liofilizadas das misturas não tratadas por AP e processadas a 100 e 450 MPa (Figura 5.20 (b), (d) e (f)). A adição da GA alterou significativamente o efeito da AP na microestrutura do IPS_C. A mistura IPS_C/GA controle, não tratada, apresentou uma microestrutura menos compacta e parece observar-se uma região onde predominam estruturas com morfologia plana e uma região onde predominam estruturas mais hexagonais, típicas de polissacarídeos.

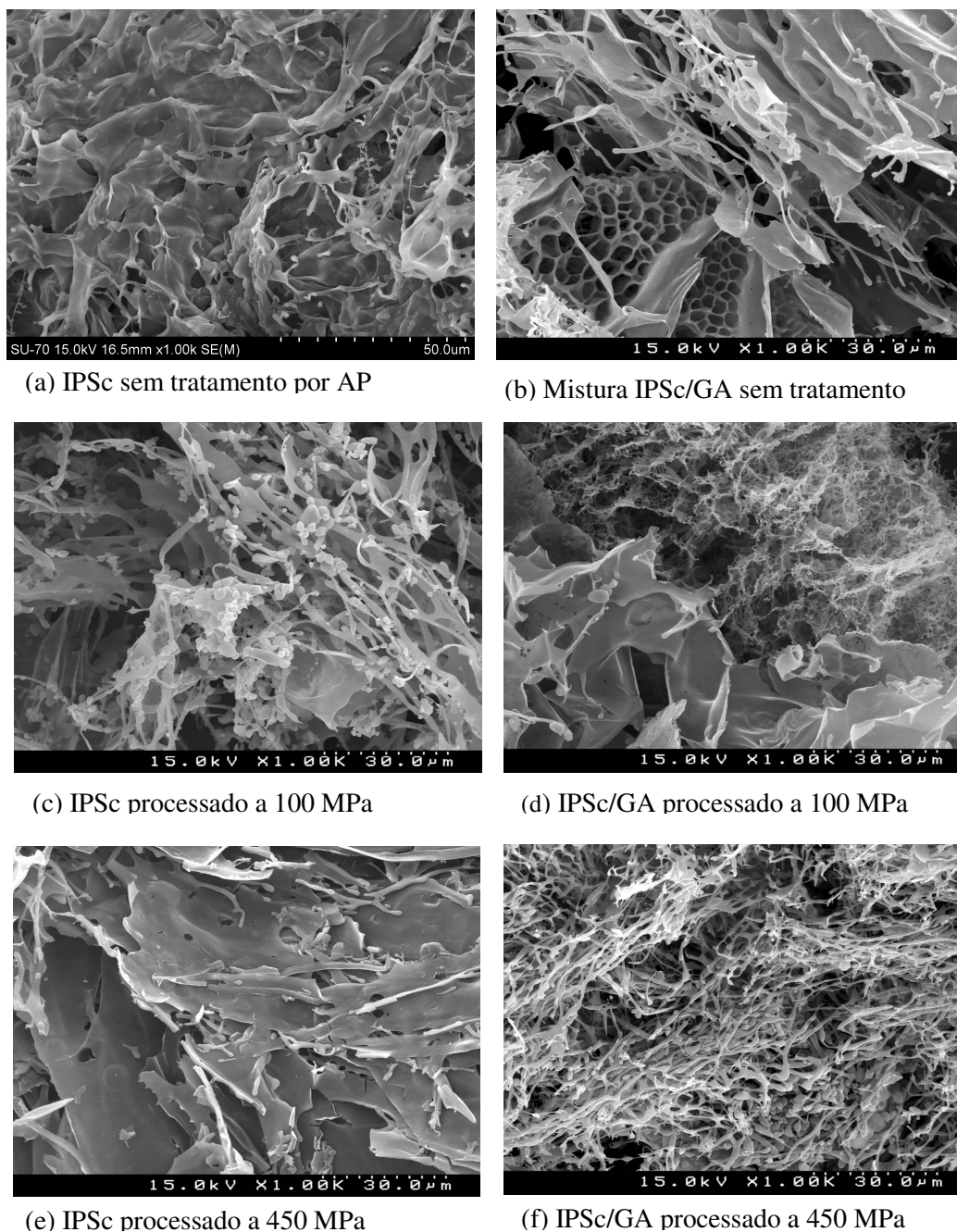


Figura 5.20 – Imagens de MEV do IPSc e das misturas IPSc/GA, controlo (a, b) e processado por AP a 100 MPa (c,d) e a 450 MPa (e,f). *Ampliação de 1000 vezes.*

A mistura tratada a 100 MPa apresentou uma microestrutura intermédia entre o IPSc controlo e o IPSc processado a 100 MPa pois ainda se observam estruturas planas mas também se observa uma região onde a estrutura é já mais filamentar e emaranhada. Esta observação corrobora a ideia de que a presença da GA retarda os efeitos do tratamento por AP. O tratamento das misturas IPSc/GA a 450 MPa resultou numa microestrutura completamente filamentar.

5.4 Considerações finais

O efeito da AP nas propriedades físico-químicas, funcionais e estruturais foi dependente da origem e método de extração dos isolados proteicos de soja.

Os isolados com grau de agregação maior mostraram ser mais sensíveis ao processamento por AP. Dois comportamentos distintos foram observados em função da gama de pressões aplicadas: Até 100 MPa, a pressão promoveu dissociação dos agregados inicialmente existentes e mantidos por interações hidrofóbicas e pontes de hidrogénio, o que resultou num aumento de solubilidade, diminuição de turbidez, aumento dos grupos SH livres, aumento da atividade emulsionante e considerável melhoria da capacidade gelificante. Valores mais elevados de pressão promoveram desnaturação das proteínas constituintes dos isolados, traduzindo-se numa diminuição da temperatura de gelificação e numa reassociação das subunidades proteicas refletindo-se numa diminuição de solubilidade, aumento de turbidez, diminuição dos grupos SH livres e diminuição da elasticidade dos géis finais obtidos. Estas alterações foram acompanhadas por alterações conformacionais da estrutura secundária das proteínas constituintes do isolado de soja e promoveram mudanças da microestrutura do isolado proteico.

Os resultados sugerem que as alterações promovidas pelo processamento por AP nas proteínas de soja (desnaturação e agregação) constituem um fator limitante para o desdobramento e reassociação durante o aquecimento térmico, necessários para a formação e fortalecimento do gel formado.

O efeito da AP sobre as propriedades funcionais analisadas para os isolados obtidos laboratorialmente foi menor, não se tendo registado alterações significativas a 100 MPa comparativamente com o isolado não tratado. Contudo, o processamento a 450 MPa permitiu obter amostras mais agregadas, com menor solubilidade, maior turbidez e menor capacidade gelificante.

A presença da GA desempenhou um papel baroprotector verificando-se uma menor intensidade dos efeitos exercidos pelo processamento por AP. A adequada manipulação da presença do polissacarídeo, das características do IPS e das condições de pressurização das amostras poderá permitir obter uma gama ampla de funcionalidades para estes sistemas.

Referências Bibliográficas

- Abbasi, S. e Dickinson, E. (2004). Gelation of κ -Carrageenan and micellar casein mixtures under high hydrostatic pressure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 1705-1714.
- Alvarez, P.A., Ramaswamy, H.S. e Ismail, A.A. (2008). High pressure gelation of soy proteins: Effect of concentration, pH and additives. *Journal of Food Engineering*, 88: 331-340.
- Allain, A-F., Paquin, P. e Subirade, M. (1999). Relationship between conformation of β -lactoglobulin in solution and gel states as revealed by attenuated total reflection fourier transform infrared spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 26: 337-344.
- Añón, M.C., de Lamballerie, M. e Speroni, F. (2011). Influence of NaCl concentration and high pressure treatment on thermal denaturation of soybean proteins. *Innovative Food Science and Engineering Technologies*, 12: 443-450.
- Arrese, E.L., Sorgentini, D.A., Wagner, J.R. e Añón, M.C. (1991). Electrophoretic, solubility, and functional properties of commercial soy protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39: 1029-1032.
- Byler, D.M. e Susi, H. (1986). Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers*, 25: 469-487.
- Chapleau, N. e Lamballerie-Anton, M. (2003). Improvement of emulsifying properties of lupin proteins by high-pressure induced aggregation. *Food Hydrocolloids*, 17: 273-280.
- Dickinson, E. e James, J.D. (2000). Influence of high pressure treatment on β -lactoglobulin-pectin associations in emulsions and gels. *Food Hydrocolloids*, 14: 365-376.
- Dumay, E.M., Kalichevsky, M.T. e Cheftel, J.-C. (1994). High-pressure unfolding and aggregation of β -lactoglobulin and the baroprotective effects of sucrose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42: 1861-1868.
- Dumoulin, M., Ozawa, S. e Hayashi, R. (1998). Textural properties of pressure-induced gels of food proteins obtained under different temperatures including subzer. *Journal of Food Science*, 63: 92-95.
- Farkas, D.F. e Hoover, D.G. (2000). High pressure processing. Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies. *Journal of Food Science*, suplemento: 47-64.
- Futenberger, S., Dumay, E. e Cheftel, J.C. (1995). Pressure-induced aggregation of β -lactoglobulin in pH 7.0 buffers. *Lebensmittel Wissenschaft Und-Technologie*, 28: 410-418.
- Galazka, V.B., Dickinson, E. e Ledward, D.A. (1996a). Changes in protein-protein and protein-polysaccharide interactions induced by high pressure. *Food Chemistry*, 57: 393-398.
- Galazka, V.B., Dickinson, E. e Ledward, D.A. (1996b). Effect of high pressure on the emulsifying behaviour of β -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*, 10: 213-219.
- Galazka, V.B., Dickinson, E. e Ledward, D.A. (1999a). Emulsifying behaviour of 11S globulin *Vicia faba* in mixtures with sulphated polysaccharides: comparison of thermal and high-pressure

treatments. *Food Hydrocolloids*, 13: 425-435.

Galazka, V.B., Dickinson, E. e Ledward, D.A. (1999b). Complexes of bovine serum albumin with sulphated polysaccharides: effects of pH, ionic strength and high pressure treatment. *Food Chemistry*, 64: 303-310.

Galazka, V.B., Dickinson, E. e Ledward, D.A. (2000a). Influence of high pressure on interactions of 11S globulin Vicia faba with κ -carrageenan in bulk solution and at interfaces. *Food Hydrocolloids*, 14: 551-560.

Galazka, V.B., Dickinson, E. e Ledward, D.A. (2000b). Influence of high pressure on protein solutions and emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 5: 182-187.

Galazka, V.B., Dickinson, E. e Ledward, D.A. (2000c). Effect of high pressure on ovalbumin-polysaccharide interactions. *High Pressure Research*, 19: 125-130.

Galazka, V.B., Ledward, D.A. e Dickinson, E. (1995). High pressure effects on emulsifying behavior of whey protein concentrate. *Journal of Food Science*, 60: 1341-1343.

Gancz, K., Alexander, M. e Corredig, M. (2005). Interactions of high methoxyl pectin with whey proteins at oil/water interfaces at acid pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 2236-2241.

Hermansson, A.M. (1979). Aggregation and denaturation involved in gel formation. In: Pourel, A. (Ed.) *Functionality and protein structure*, American Chemical Society, 82-103.

Hoover, D.G., Metrick, C., Papineau, A.M., Farkas, D.F. e Knorr, D. (1989). Biological effects of high hydrostatic pressure on food micro-organisms. *Food Technology*, 47: 99-107.

Kato, A., Matsuda, T., Matsudomi, N. e Kobayashi, K. (1984). Determination of protein hydrophobicity using a sodium dodecyl sulfate binding method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32: 284-288.

Keerati-U-Rai, M. e Corredig, M. (2009). Effect of dynamic high pressure homogenization on the aggregate state of soy protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 3556-3562.

Knorr, D. (1993). Effects of high-hydrostatic-pressure processes on food safety and quality. *Food Technology*, 47: 156-161.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

Laplante, S., Turgeon, S.L. e Paquin, P. (2006). Emulsion-stabilizing properties of chitosan in the presence of whey protein isolate: Effect of the mixture ratio, ionic strength and pH. *Carbohydrate Polymers*, 65 : 479-487.

Lefèvre, T. e Subirade, M. (2001). Molecular structure and interaction of biopolymers as viewed by fourier transform infrared spectroscopy: model studies on β -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*, 15: 365-376.

Li, H., Zhu, K., Zhou, H. e Peng, W. (2011). Effects of hydrostatic pressure on some functional and nutritional properties of soy protein isolate for infant formula. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 12028-12036.

Li, H., Zhu, K., Zhou, H. e Peng, W. (2012). Effects of high hydrostatic pressure treatment on

- allergenicity and structural properties of soybean protein isolate for infant formula. *Food Chemistry*, 132 : 808-814.
- Mertens, B. e Knorr, D. (1992). Developments of non-thermal processes for food preservation. *Food Technology*, 46: 126-133.
- Messens, W., Van Camp, J. e Huyghebaert, A. (1997). The use of high pressure to modify the functionality of food proteins. *Trends in Food Science and Technology*, 8: 107-112.
- Mills, E.N.C., Marigheto, N.A., Wellner, N., Fairhurst, S.A., Jenkins, J.A., Mann, R. e Belton, P.S. (2003). Thermally induced structural changes in glycinin, the 11S globulin of soya bean – an in situ spectroscopic study. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1648: 105-114.
- Molina, E. e Ledward, D.A. (2003). Effects of combined high-pressure and heat treatment on the textural properties of soya gels. *Food Chemistry*, 80: 367-370.
- Molina, E., Defaye, A.B. e Ledward, D.A. (2002). Soy protein pressure-induced gels. *Food Hydrocolloids*, 16: 625-632.
- Molina, E., Papadopoulou, A. e Ledward, D.A. (2001). Emulsifying properties of high pressure treated soy protein isolate and 7S and 11S globulins. *Food Hydrocolloids*, 15: 263-269.
- Nagano, T., Akasaka, T. e Nishinari, K. (1994). Dynamic viscoelastic properties of glycinin and β -conglycinin gels from soybeans. *Biopolymers*, 34: 1303-1309.
- Nakai, S.J. (1983). Structure-function relationships of food proteins with na emphasis on the importance of protein hydrophobicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31: 676-683.
- O'Reilly, C.E., Kelly, A.L., Murphy, P.M. e Beresford, T.P. (2001). High-pressure treatment application in cheese manufacture and ripening. *Trends in Food Science and Technology*, 12: 51-59.
- Okuno, A., Kato, M. e Taniguchi, Y. (2006). The secondary structure of pressure- and temperature-induced aggregates of equine serum albumin studied by FT-IR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1764: 1407-1412.
- Peñas, E., Préstamo, G., Polo, F. e Gomez, R. (2006). Enzymatic proteolysis, under high pressure of soybean whey: analysis of peptides and the allergen Gly m 1 in the hydrolysates. *Food Chemistry*, 99: 569-573.
- Petrucelli, S. e Añón, M.C. (1994). Relationship between the method of obtention and the structural and functional properties of soy protein isolates. 1. Structural and unctional properties of soy protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42: 2161-2169.
- Puppo, C., Speroni, F., Chapleau, N., de Lamballerie-Anton, M., Añón, C., Anton, M. e Anton, M. (2005). Effect f high-pressure treatment on emulsifying properties of soybean proteins. *Food Hydrocolloids*, 19: 289-296.
- Puppo, M.C., Chapleau, N., Speroni, F., de Lamballerie-Anton, M., Michel, F. e Añón, C., Anton, M. (2004). Physicochemical modifications of high-pressure-treated soybean protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 1564-1571.
- Puppo, M.C., Lupano, C.E. e Añón, M.C. (1995). Gelation of soybean protein isolates in acidic conditions. Effect of pH and protein concentration. *Journal of Agricultural and Food*

Chemistry, 43: 2356-2361.

Smelt, J.P.P.M. (1998). Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends in Food Science and Tecnology*, 9: 152-158.

Speroni, F., Beaumal, V., de Lamballerie, M., Anton, M., Añón, M.C.e Puppo, M.C. (2009). Gelation of soybean proteins induced by sequential high-pressure and thermal treatments. *Food Hydrocolloids*, 23: 1433-1442.

Speroni, F., Jung, S. e de Lamballerie, M. (2010). Effects of calcium and pressure treatment on thermal gelation of soybean protein. *Journal of Food Science*, 75: E30-E38.

Subirade, M., Gueguen, J. e Pézolet, M. (1994). Conformational changes upon dissociation of a globular protein from pea: a Fourier transform infrared spectroscopy study. *Biochimica et Biophysica Ata*, 1205: 239-247.

Surewicz, W.K. e Mantsch, H.H. (1988). New insight into the protein secondary structure from resolution-enhanced infrared spectra. *Biochimica et Biophysica Ata*, 952: 115-130.

Tang, C. H. e Sun, X. (2011). A comparative study of physicochemical and conformational properties in three vicinils from Phaseolus legumes: Implications for the structure-function relationship. *Food Hydrocolloids*, 25: 315-324.

Tang, C-H. e Ma, C-Y. (2009). Effect of high pressure treatment on aggregation and structural properties of soy protein isolate. *LWT-Food Science and Technology*, 42: 606-611.

Torrezan, R., Tham, W.P., Bell, A.E., Frazier, R.A. e Cristianini, M. (2007). Effects of high pressure on functional properties of soy protein. *Food Chemistry*, 104: 140-147.

Utsumi, S., Damodaran, S. e Kinsella, J.E. (1984). Heat-induced interaction between soybean proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32: 1402-1407.

Wang, X-S., Tang, C-H., Li, B-S., Yang, X-Q., Li, L. e Ma, C-Y. (2008). Effects of high-pressure treatment on some physicochemical and functional properties of soy protein isolates. *Food Hydrocolloids*, 22: 560-567.

Yuan, F., Xu, D., Qi, X. e Zhao, J. (2013). Impact of high hydrostatic pressure on the emulsifying properties of whey protein isolate-chitosan mixtures. *Food Bioprocess Technology*, 6 : 1024-1031.

Zhang, H., Li, L. e Mittal, G.S. (2010). Effects of high pressure processing on soybean beta-conglycinin. *Journal of Food Process Engineering*, 33: 568-583.

Zhang, H.K., Li, L.T. Tatsumi, E. e Kotwal, S. (2003). Influence of high pressure on conformational changes of soybean glycinin. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 4: 269-275.

Conclusões gerais e trabalho futuro

Recorrendo a diferentes estratégias para manipulação das propriedades funcionais de proteínas de soja, nomeadamente através da adição de um polissacarídeo neutro com propriedades estruturais controladas, da combinação da adição desse polissacarídeo com a hidrólise enzimática controlada das proteínas ou com o tratamento por alta pressão, foi possível alterar a funcionalidade destas proteínas vegetais contribuindo para alargar as potenciais aplicações na formulação de novos produtos alimentares.

A extração de IPS a partir de diferentes produtos intermediários da extração industrial do óleo de soja deu origem a isolados que, apesar de terem composição proteica semelhante, caracterizaram-se por diferentes graus de desnaturação e agregação, que se refletiram nas diferentes propriedades funcionais estudadas, evidenciando o papel determinante das condições do tratamento industrial das matérias-primas sobre as propriedades dos IPS. A severidade do processamento da matéria-prima aumentou a desnaturação e pré-agregação das proteínas constituintes dos isolados resultando na diminuição da solubilidade, aumento da turbidez, diminuição de grupos sulfidrilo livres, no decréscimo da temperatura e tempo de gelificação bem como na diminuição da rigidez e elasticidade dos géis finais obtidos. Comparativamente aos isolados obtidos laboratorialmente, os isolados comerciais, totalmente desnaturados e constituídos por macro-agregados insolúveis em água, formaram géis menos elásticos e com maior mobilidade molecular.

A adição de galactomananas com propriedades estruturais controladas, nomeadamente, massa molecular e grau de ramificação, teve um efeito positivo na capacidade gelificante das proteínas de soja influenciando claramente a microestrutura dos géis formados. A separação de fases entre proteínas de soja e galactomananas, em virtude da incompatibilidade termodinâmica entre os dois biopolímeros, foi visível em todos os sistemas e condições estudadas resultando na diminuição da concentração crítica de gelificação, na obtenção de géis mais rígidos, em consequência da segregação e concentração local de cada biopolímero, e no decréscimo da temperatura de gelificação. A extensão destas alterações foi dependente da massa molecular, grau de ramificação e da

razão IPS/GM concluindo-se que o aumento da massa molecular e o decréscimo do grau de ramificação da GM intensificaram os efeitos da adição do polissacarídeo.

A hidrólise enzimática controlada das proteínas de soja por ação da bromelina modificou as propriedades funcionais destas proteínas, nomeadamente a capacidade gelificante e emulsionante, tendo melhorado significativamente a solubilidade dos hidrolisados. Os efeitos descritos foram dependentes do grau de hidrólise. Os resultados mostraram que hidrólises menos extensas, com GH < 15 %, tiveram um efeito positivo na capacidade gelificante das proteínas de soja, o qual foi invertido para hidrólises mais extensas resultando na perda de capacidade de gelificação, o que se traduziu no aumento da temperatura de gelificação e no decréscimo da rigidez dos géis. Em concordância com os resultados obtidos noutros capítulos, mostrou-se que, nas condições estudadas, a adição da GA teve um efeito positivo nas propriedades viscoelásticas dos hidrolisados de proteína de soja. A concentração crítica limite de compatibilidade entre os hidrolisados de proteína de soja e a goma de alfarroba aumentou com o decréscimo do GH e da massa molecular do polissacarídeo. Por outro lado, o aumento do GH exerceu um efeito negativo nas propriedades emulsionantes, o qual foi atenuado por adição da goma de alfarroba.

O efeito da AP sobre as propriedades físico-químicas e funcionais dos IPS foi influenciado pela origem do isolado e pelas condições de tratamento mostrando-se que o grau de pré-agregação das proteínas constituintes dos isolados e o balanço entre a quantidade de proteína desnaturada e agregada por efeito da pressão são determinantes para a solubilidade, capacidade gelificante e emulsionante das proteínas de soja. Isolados constituídos por proteínas com menor estado de pré-agregação revelaram-se melhores emulsionantes embora nestes casos a adição da GA não tenha apresentado um efeito benéfico nas propriedades emulsionantes.

O processamento até 100 MPa desencadeou um aumento da atividade emulsionante e considerável melhoria da capacidade gelificante como resultado da desnaturação das proteínas de soja por efeito do tratamento por AP. Contudo, valores de pressão superiores resultaram no decréscimo da temperatura de gelificação e numa reassociação das subunidades proteicas, diminuindo a elasticidade dos géis finais provavelmente como resultado da desnaturação e subsequente agregação das proteínas induzida por efeito de

pressões mais elevadas. O aumento da pressão no intervalo 0.1-300 MPa provocou uma melhoria da atividade emulsionante, a qual foi aumentada por adição da GA. A presença de GA teve um papel baroprotetor observando-se que na presença da GA os efeitos do tratamento por pressão foram menos pronunciados.

Ao finalizar este trabalho e tendo como base as conclusões obtidas da análise dos resultados, é possível ter-se a percepção de que ainda há muito trabalho por desenvolver nesta área.

Tendo em conta que uma grande parte dos produtos alimentares são predominantemente ácidos seria oportuno e interessante avaliar algumas das estratégias aqui estudadas, nomeadamente o efeito da adição de galactomananas nas propriedades gelificantes das proteínas de soja e o efeito de diferentes condições de processamento por alta pressão na capacidade gelificante e emulsionante destas proteínas, a valores de pH ácidos.

Dado o interesse económico e industrial em valorizar sub-produtos seria vantajoso extrair os polissacarídeos dos resíduos de extração do IPS e adicioná-los às proteínas de soja, podendo combinar-se com outras estratégias, concretamente hidrólise enzimática parcial das proteínas e tratamento por alta pressão, de forma a avaliar o efeito destes polissacarídeos e do efeito combinado nas propriedades funcionais destas proteínas vegetais.

Num trabalho futuro seria ainda importante aumentar a gama de concentrações e massas moleculares da galactomanana nas misturas IPS/GA submetidas a tratamento por alta pressão.

Por outro lado, e com base na bibliografia, o efeito do tratamento combinado por alta pressão e hidrólise enzimática parcial das proteínas de soja mostrou diminuir as reações alérgicas provocadas por algumas substâncias existentes na soja (Peñas *et al.*, 2006). Assim, propõe-se avaliar o efeito desse tratamento combinado nas propriedades funcionais mais especificamente sobre a capacidade gelificante e emulsionante das proteínas de soja de forma a estudar se o benefício à saúde se alia às vantagens funcionais.

Como se sabe uma das limitações às aplicações dos hidrolisados de soja em formulações alimentares é o amargor dos péptidos obtidos (Sun, 2011) como resultado da formação de pequenos peptidos hidrofóbicos (Ney, 1979). Com base nos resultados obtidos no trabalho apresentado nesta tese concluiu-se que tratamentos a pressões mais elevadas promovem a agregação, por estabelecimento de interações hidrofóbicas e ligações covalentes, pelo que seria oportuno avaliar o efeito do tratamento combinado entre hidrólise enzimática parcial e tratamento por alta pressão, a valores iguais ou superiores a 450 MPa, no amargor dos hidrolisados obtidos.

Sun, X.D. (2011). Enzymatic hydrolysis of soy proteins and the hydrolysates utilisation. Review. *International Journal of Food Science & Tecnology*, 46: 2447-2459.

Ney, K.H. (1979). Bitterness of peptides: amino acid composition and chain length. Em *Food Taste Chemistry*. p. 149-173. Washington, D.C; American Chemical Society.